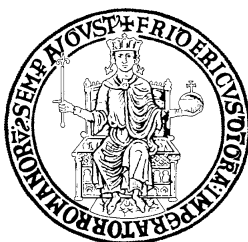


UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA



**DOTTORATO DI RICERCA IN MORFOLOGIA CLINICA E
PATOLOGICA**

**“Valutazione dello stato mutazionale degli oncogeni predittivi di
risposta terapeutica al trattamento delle neoplasie solide con inibitori
di EGFR: validazione analitica e clinica.”**

Relatore

Ch.mo Prof.

GIANCARLO TRONCONE

Candidato

UMBERTO MALAPELLE

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

INDICE

Riassunto	1
CAPITOLO 1: Il ruolo di EGFR nella terapia biologica del tumore non a piccole cellule del polmone (NSCLC).....	2
Studio pilota per la rilevazione delle mutazioni di EGFR e KRAS su campioni di citologia polmonare.....	4
Implementazione e validazione analitica di tecniche di biologia molecolare più sensibili del sequenziamento genico diretto per la rilevazione delle mutazioni di EGFR su campioni di citologia polmonare	8
Validazione clinica del “fragment assay” per la rilevazione delle delezioni dell’esone 19 e della “Real Time PCR” con sonde TaqMan per le mutazioni dell’esone 21 di EGFR.....	14
CAPITOLO 2: Il ruolo di KRAS nella terapia biologica del carcinoma del colon – retto metastatico (CRCm)	21
Implementazione e validazione analitica del sequenziamento genico diretto per la rilevazione delle mutazioni a carico dei codoni 12 e 13 dell’esone 2 di KRAS.....	23
Sviluppo e validazione clinica dell’ “High Resolution Melting Analysis” per la rilevazione di mutazioni a carico di KRAS	32
Figure	41
Tabelle	54
Bibliografia	59

RIASSUNTO

In questo elaborato sono presentati i dati relativi alle ricerche svolte dal Dr. Umberto Malapelle durante i tre anni di Dottorato in “Morfologia Clinica e Patologica”. L’ambito degli studi, in continuità con quanto svolto durante l’attività di Tesi per la laurea in Biotecnologie Mediche, è quello relativo alla valutazione dello stato mutazionale degli oncogeni predittivi di risposta terapeutica al trattamento delle neoplasie solide con inibitori del recettore del fattore di crescita epiteliale (EGFR), affrontando con particolare attenzione gli aspetti riguardanti la validazione analitica e clinica delle metodologie adoperate per identificare tali alterazioni.

I trattamenti adoperati per il tumore non a piccole cellule del polmone (NSCLC) e per quello coloretale metastatico (CRCm) hanno subito profondi cambiamenti negli ultimi anni, in modo particolare grazie all’introduzione nella pratica clinica di farmaci biologici a target molecolare. L’impiego di tali farmaci è subordinato alla definizione del profilo genico del dominio tirosin chinasi di EGFR e del dominio GTPasi di KRAS, rispettivamente per l’NSCLC e per il CRCm.

La necessità di investire in tali attività di ricerca sorge dall’evidenza che una delle più importanti sfide per la ricerca traslazionale in anatomia patologica del presente e dell’immediato futuro è quella di poter supportare la definizione dei trattamenti oncologici con robuste metodologie di caratterizzazione biomolecolare che diano la possibilità di definire in maniera ottimale la probabilità di risposta ai trattamenti biologici.

CAPITOLO 1:

Il ruolo di EGFR nella terapia biologica del tumore non a piccole cellule del polmone (NSCLC).

La determinazione dello stato mutazionale del recettore del fattore di crescita epiteliale (EGFR) rappresenta un elemento importante ai fini della scelta terapeutica per i pazienti affetti da carcinoma del polmone a cellule non piccole (NSCLC). Tale valutazione consente nei pazienti con NSCLC in stadio avanzato l'impiego, come mono-terapia in prima linea, degli inibitori tirosino-chinasici (TKI) di EGFR gefitinib ed erlotinib. (1) Tuttavia tale possibilità terapeutica è limitata a quei pazienti contraddistinti da alterazioni strutturali del gene codificante per EGFR; tali anomalie di sequenza genica sono prevalentemente associate agli esoni 19 (delezioni in frame) e 21 (mutazione puntiforme L858R). Queste alterazioni sono più frequenti nel sesso femminile, nell'istotipo adenocarcinoma, nei pazienti asiatici ed in quelli non fumatori. (2) I pazienti con mutazione di EGFR grazie al trattamento con TKI hanno una migliore qualità di vita, una elevata percentuale di risposta al trattamento (RR) ed una progressione libera da neoplasia (PFS) prolungata. Come dimostrato nel clinical trial IPASS i pazienti non portatori di mutazioni nel gene dell'EGFR possono essere trattati unicamente con la chemioterapia, (3) infatti la somministrazione del farmaco biologico in assenza di mutazioni comporta ulteriore danno alle condizioni di salute del paziente (effetto detrimentalmente).

La determinazione dello stato di EGFR è generalmente effettuata su campione biotico ottenuto dalla neoplasia primitiva, in alcuni casi tale valutazione è eseguita anche sulla metastasi corrispondente. Spesso il tumore è diagnosticato in uno stadio avanzato (IIIB- IV) nel quale l'approccio chirurgico è sconsigliato; per tale motivo la piccola biopsia endoscopica o trans-toracica e/o il campione citologico rappresentano, in molti casi, gli unici tipi di

campioni a disposizione.(1) Gli studi clinici di validazione che hanno portato alla approvazione da parte del FDA e dell' EMEA della terapia target con TKI hanno arruolato i pazienti testando EGFR esclusivamente su campioni istologici di NSCLC. (3, 4) Al contrario, il campione citologico non è stato utilizzato nei trials clinici. Tuttavia, la necessità clinica di valorizzare il campione citologico ha spinto numerosi gruppi a svolgere ricerche finalizzate alla validazione della citologia come un campione biologico valido sul quale analizzare le mutazioni genetiche di bersagli molecolari. (1) I primi studi su campione citologico hanno utilizzato campioni prelevati specificamente per il test molecolare. (5-9) In particolare un secondo prelievo, in aggiunta a quello per la microscopia, veniva sospeso in un buffer dedicato all'estrazione del DNA. (5-9) Studi successivi hanno testato EGFR su campioni citologici e paragonato il risultato a quello ottenuto su campione istologico corrispondente prelevato dagli stessi pazienti di cui era disponibile la citologia. (10-13) Tale approccio ha mostrato sui citologici risultati quasi sempre concordanti con quelli ottenuti su istologico. Sulla scorta di tali studi metodologici, più di recente diverse Istituzioni hanno riportato la loro esperienza su campioni citologici di routine. (14-17) I risultati ottenuti sono stati altamente positivi; come atteso, le mutazioni sono state prevalentemente riscontrate sui campioni citologici ottenuti da donne, non fumatrici e istotipo adenocarcinoma, con una frequenza (10%) di mutazione riscontrata usualmente nella popolazione caucasica. (14-17) Questi risultati sono stati ottenuti indipendentemente dal tipo di campione (esfoliativo/aspirativo) e dal tipo di preparazione (striscio diretto/cell block).

Studio pilota per la rilevazione delle mutazioni di EGFR su campioni di citologia polmonare.

La scarsità di materiale che spesso caratterizza il campione citologico può limitarne l'impiego (18). Un ulteriore problema è rappresentato dalle implicazioni medico-legali legate al "sacrificio" di un vetrino allestito contenente le cellule neoplastiche sulla cui osservazione microscopica si è basata la diagnosi di malignità; poiché non vi sono, al momento, delle indicazioni chiare circa l'utilizzo dei campioni di archivio, spesso i vetrini selezionati dal patologo "primario", che ha effettuato la diagnosi cito-istopatologica, ed inviati ad un centro di riferimento per l'analisi molecolare, sono spesso non ottimali e rappresentativi della lesione. In questo contesto diventa fondamentale la definizione della tecnica di riferimento da utilizzare nel singolo laboratorio per rilevare le alterazioni a carico di EGFR. Per tale motivo abbiamo disegnato uno studio che ci consentisse di definire il "gold standard" per l'analisi delle mutazioni a carico degli esoni 19 e 21 di EGFR.

METODI

Campioni oggetti dello studio

Il laboratorio di Citopatologia molecolare dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, in cui ho svolto la mia attività di ricerca è uno dei principali centri di riferimento per la rilevazione delle alterazioni a carico di oncogeni, predittive di risposta ai trattamenti con agenti biologici.

Nel periodo compreso tra Luglio 2010 ed Aprile 2011 sono giunti al centro 214 campioni di NSCLC da 12 differenti anatomie patologiche del Sud Italia. La maggior parte dei casi (105/214) erano campioni citologici tra cui campioni allestiti su strato sottile (LBC, n = 62), strisci citologici convenzionali (n = 32) e *cell blocks* (n = 11). Dato il numero di campioni, abbiamo deciso di rivolgere la nostra attenzione in modo particolare ai campioni LBC,

iccludendo nello studio solo i campioni sospesi in almeno 10ml di soluzione preservante CytoLyt (Cytoc UK, Crawley, UK). In questo modo, 42 campioni sono risultati idonei. Il protocollo dello studio (185/10) è stato approvato dal Comitato Etico 'Carlo Romano' dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. Le caratteristiche dei pazienti, recuperate dai referti inviatici sono riportate nella tabella 1. La maggior parte dei casi (33/42) erano stati diagnosticati come adenocarcinoma (ADC), due come carcinomi squamosi (SCC) e sette erano NSCLC non altrimenti specificati (NAS). In otto casi la subtipizzazione è stata effettuata utilizzando un'immunocolorazione per *thyroid transcription factor 1*, p63, citocheratine 5/6 e Napsina A. Data l'assenza di linee guida per l'analisi di EGFR da campioni LBC abbiamo deciso di disegnare uno studio a due braccia. Come mostrato in figura 1, in ogni singolo caso il DNA è stato estratto due volte. La prima estrazione è stata effettuata partendo direttamente dalla soluzione CytoLyt, mentre l'altro campione di DNA è stato ottenuto dalle cellule neoplastiche prelevate dopo microdissezione laser, seguendo il protocollo precedentemente riportato e validato. La rilevazione delle mutazioni a carico degli esoni 19 e 21 di EGFR è stata effettuata mediante amplificazione e sequenziamento genico diretto (referenza di come precedentemente riportato).

RISULTATI

Tutti i campioni il cui DNA è stato estratto direttamente dalla soluzione CytoLyt sono risultati adeguati per la rilevazione dello stato mutazionale di EGFR. Per quanto concerne il DNA ottenuto dopo microdissezione laser, solo per due campioni si è presentata la necessità di ripetere l'analisi una seconda volta prima di ottenere un risultato adeguato. Dall'analisi condotta sul DNA estratto in modo diretto dal CytoLyt sono risultati mutati quattro campioni. Tutte le mutazioni rilevate sono state confermate sui corrispondenti campioni per i quali il DNA è stato estratto dopo microdissezione laser delle cellule neoplastiche ed altre quattro

mutazioni a carico dell'esone 19 di EGFR (E746 - A750del n =2; L747-A750del n =1 e I745insKIPVAI n = 1) sono state rilevate dal sequenziamento genico diretto solo in seguito a micro dissezione laser della componente neoplastica (figura 2). La percentuale totale di mutazioni di EGFR rilevate per i campioni analizzati (n = 42) è stata del 19%, in linea con i dati riportati in letteratura per i campioni istologici. Il numero minimo di cellule necessario per l'identificazione delle mutazioni di EGFR è risultato essere 25. I risultati ottenuti perdono di consistenza quando si analizzano solo 5 cellule.

DISCUSSIONE

I campioni citologici di lesioni neoplastiche polmonari includono spesso una componente cellulare non tumorale e questo rappresenta il motivo per il quale il sequenziamento genico diretto perde la capacità di identificare una eventuale mutazione.(14) Ma, quando l'analisi è condotta su DNA estratto da cellule neoplastiche prelevate tramite micordissezione laser il sequenziamento genico diretto rappresenta ancora il 'gold standard'. In questo studio abbiamo deciso di applicare tale procedura su campioni allestiti mediante citologia su strato sottile per le ragioni riportate di seguito: i campioni LBC sono frequentemente utilizzati nella pratica dei laboratorio di citopatologia, infatti rappresentano la parte più consistente (62/105; 59%) di quelli che ci vengono inviati dai centri esterni per la valutazione dello stato mutazionale di EGFR. Inoltre il modo in cui il campione viene raccolto per LBC permette di capitalizzare il material prelevato, consentendo di effettuare, oltre all'esame morfologico, l'estrazione del DNA, dell'RNA ed altre tecniche ancillari, come l'immunoistochimica per la subtipizzazione dei NSCLC – NAS in ADC o SCC (14). La serie di campioni considerata in questo studio comprende quattro campioni LBC preventivamente utilizzati per analisi immunoistochimiche dai patologi che li hanno inviati e comunque sono risultati adeguati per la valutazione dello stato mutazionale di EGFR. Il rate di mutati per EGFR rilevato nella

nostra serie di campioni LBC (19%) è in linea con la letteratura. La presenza delle mutazioni è associata all'istotipo ADC (24%) e al sesso femminile (30%). L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare la procedura più adeguata per l'identificazione delle mutazioni a carico di EGFR su campioni citologici LBC. In base ai risultati analizzati, possiamo affermare che quando il sequenziamento genico diretto è applicato dopo micro dissezione laser della componente neoplastica permette di identificare in modo adeguato i pazienti che possono accedere al trattamento con inibitori ATP – mimetici del recettore dell'EGF. Tenendo conto del tempo impiegato per effettuare l'analisi dello stato di EGFR, dei costi da sostenere per acquisire la strumentazione dedicata alla micordissezione laser e all'elevato grado di preparazione necessario per gli operatori, si rende necessario identificare tecnologie capaci di ottenere gli stessi risultati superando i limiti appena considerati. Per questo, e per i motivi riportati successivamente, abbiamo deciso di disegnare lo studio che segue.

Implementazione e validazione analitica di tecniche di biologia molecolare più sensibili del sequenziamento genico diretto per la rilevazione delle mutazioni di EGFR su campioni di citologia polmonare.

Nei laboratori dove l'analisi di EGFR è centralizzata il tasso di inadeguati è basso ma non trascurabile (10%), come mostrato da Pang *et al.* (16) L'implementazione di metodiche più sensibili è in grado di ridurre significativamente il tasso di campioni ritenuti inadeguati. In maniera analoga, nell'esperienza pubblicata da Allegrini *et al.* (17) nonostante l'impiego di una metodologia estremamente sensibile, (Scorpion-ARMS; TheraScreen EGFR29 kit) il tasso di inadeguati era pari al 14%. Questi dati confermano che l'esternalizzazione del test EGFR richiede una stretta interazione tra l'esame microscopico e quello molecolare. Per limitare il numero di inadeguati abbiamo deciso di utilizzare tecniche di biologia molecolare capaci di ottenere una sensibilità paragonabile al sequenziamento genico diretto preceduto da micro dissezione laser, ma con una esecuzione più veloce e che si confacesse maggiormente alle esigenze di un processo clinico – diagnostico.

METODI

Nel periodo compreso tra Luglio 2010 e Dicembre 2011 sono giunti, da 12 istituzioni differenti, al laboratorio di Citopatologia molecolare dell'Università degli Studi di Napoli Federico II 560 campioni di NSCLC per effettuare la determinazione dello stato mutazionale di EGFR. La maggior parte di questi casi (367/527) era rappresentata da campioni citologici; questi comprendevano 208 LBC, 127 strisci di citologia convenzionale e 32 *cell blocks*. Ancora una volta, dato il numero e la disponibilità di materiale residuo dopo aver effettuato il test per EGFR, abbiamo deciso di focalizzare la nostra attenzione ai campioni LBC. Il protocollo dello studio (185/10) è stato approvato dal Comitato Etico 'Carlo Romano' dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. Seguendo i criteri di inclusione riportati

nella sezione precedente, sono risultati idonei ai fini dello studio 58 campioni; questi comprendevano 22 casi per i quali lo stato mutazionale di EGFR era stato rilevato seguendo lo schema del lavoro precedente (“*Studio pilota per la rilevazione delle mutazioni di EGFR e KRAS su campioni di citologia polmonare*”) (19). La maggior parte (44/58) dei casi oggetto di questo studio erano stati diagnosticati come ADC, uno come SCC e 13 come NSCLC – NAS. In 17 casi, i patologi che hanno inviato i campioni, hanno effettuato la subtipizzazione basandosi su una immunocolorazione per *thyroid transcription factor 1*, p63, citocheratine 5/6 e Napsina A. Il disegno di questo studio è mostrato in figura 3; in ogni singolo caso considerato il DNA è stato estratto due volte, una volta dal *cell – pellet* ed un'altra dal campione allestito per citologia su strato sottile, dopo microdissezione laser, come descritto in precedenza. (19) Per entrambi i campioni, lo stato mutazione dell'esone 19 e 21 di EGFR è stato rilevato mediante sequenziamento genico diretto ed high-resolution melting analysis (HRMA, vedi capitolo 2). Inoltre, seguendo il protocollo precedentemente riportato da Rosell et al (20), lo stato mutazionale dell'esone 19 è stato valutato anche tramite un saggio per l'analisi della lunghezza di frammenti, mentre per l'esone 21 è stato valutato utilizzando un saggio TaqMan in RT – PCR. Per verificare la consistenza dei dati ottenuti tutti gli esperimenti sono stati condotti in duplicato.

Validazione analitica delle tecniche adoperate

Prima dell'introduzione nella pratica clinica, abbiamo valutato il limite di rilevazione (LOD) delle mutazioni delle tecniche sviluppate nel nostro laboratorio utilizzando il DNA estratto dalla linea cellulare PC9 in cui è presente la delezione Glu746-Ala750 a carico dell'esone 19, e dalla linea cellulare H1975 in cui è presente la mutazione L858R dell'esone 21. Il DNA wild – type per entrambe le mutazioni è stato ottenuto dalla linea cellulare A549. Quest'ultima linea e l'H1975 le abbiamo ottenute dalla American Type of Culture Collection

(Rockville, MD). La linea PC9 è stata ottenuta dall'istituto CNR/IEOS (Napoli, Italia). Per determinare il LOD, abbiamo generato delle diluizioni seriali (50%, 30%, 20%, 10% e 5%) tra DNA mutato (PC9 and H1975) e wild - type (A549). Il LOD per le mutazioni dell'esone 19 e 21 è risultato essere rispettivamente del 10% (Figura 1A) e del 5% (Figura 1B). Per definire il numero minimo di cellule neoplastiche necessarie alla valutazione dello stato mutazionale di EGFR, abbiamo microdissezionato al laser 5, 25, 50 o 100 cellule PC-9 e H1975 allestite su vetrino e colorate secondo Papanicolau. Solo quando si prelevano 5 cellule i risultati ottenuti non sono riproducibili. Per verificare l'affidabilità dei dati ognuno degli esperimenti è stato effettuato in triplicato.

Determinazione dello stato mutazionale degli esoni 19 e 21 di EGFR

Il DNA è stato estratto utilizzando il QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Crawley, West Sussex, UK) seguendo le istruzioni del costruttore e reso spendendo il campione in 20 μ l di acqua DNAsi RNAsi free. La valutazione della quantità del DNA estratto è stata effettuata mediante un nano spettrofotometro (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, Milan, Italy). Le delzioni dell'esone 19 di EGFR sono state rilevate mediante analisi della lunghezza dei frammenti in elettroforesi capillare, mentre la mutazione L858R dell'esone 21 è stata rilevata mediante RT – PCR con sonde TaqMan. I primers, le sonde, le condizioni di PCR ed i criteri di interpretazione sono stati precedentemente descritti (20 - 21). I prodotti di PCR risultati mutati ad una delle tecniche appena menzionate, sono stati confermati al sequenziamento genico diretto. In caso di risultati discordanti la conferma è avvenuta mediante sequenziamento dopo clonaggio dei prodotti di amplificazione ottenuti con il TOPO TA *cloning vector* (Life Technologies, Monza, Italy) seguendo le istruzioni del costruttore. Per ogni campione, 30 plasmidi sono stati purificati e sequenziati utilizzando il BigDye Terminator kit v.3.1 (Life Technologies), ed analizzati con l'analizzatore genetico ABI 3730

analyzer (Life Technologies). I dati di sequenza sono stati analizzati utilizzando il software Mutation Surveyor (SoftGenetics, State College, PA, USA). Il campione è stato definito mutato quando almeno un clone mostrava la mutazione.

Processazione pre – analitica dei campioni

Basandosi sui dati ottenuti dagli esperimenti di validazione, due patologi in modo indipendente hanno revisionato ogni campione prima di effettuare il test, considerando adeguato un campione che contenesse almeno 25 cellule neoplastiche o una grande quantità di cellule delle quali almeno il 20% risultava essere neoplastica. Nel caso dei campioni istologici ci sono state inviate quattro (per le resezioni chirurgiche) o cinque (per le biopsie) sezioni seriali da 5 µm. La prima e l'ultima delle sezioni inviateci sono state colorate con ematossilina ed eosina (H&E) per verificare l'adeguatezza della componente neoplastica. Nei campioni in cui la componente neoplastica risultava essere inferiore al 20%, l'arricchimento è avvenuto tramite micro dissezione laser (LCM). La processazione preanalitica dei campioni citologici è stata differente in relazione al tipo di preparazione ed alla percentuale di cellule neoplastiche. Gli strisci convenzionali sono stati prima fotografati (Leica DMD 108, Milano, Italia) per archiviare la citomorfologia del campione. Il coprioggetto è stato rimosso incubando il campione in xylene a temperatura ambiente ognuno in un tubo da 50 ml per evitare contaminazioni. Gli strisci con una percentuale di cellule neoplastiche > 20% non hanno richiesto un arricchimento e tutto il campione è stato rimosso con un bisturi ed introdotto in un tubo da 1.5ml. Analogamente sono stati processati i cell blocks (CB) con una percentuale di cellule neoplastiche superiore al 20%, in particolare da 6 a 9 sezioni sono state introdotte in un tubo da reazione. Al contrario, nel caso di campioni con una percentuale di cellule neoplastiche inferiore al 20%, l'area con la maggiore componente neoplastica è stata

marcata, o su di una H&E corrispondente per i CBs o con una penna smerigliatrice sulla superficie posteriore del vetrino per i strisci convenzionali. Le aree maggiori di 2 mm di diametro sono state microdissezionate manualmente, mentre quelle inferiori ai 2 mm sono state prelevate tramite microdissezione laser per prelevare una popolazione di almeno 25 cellule neoplastiche. Il campione è risultato essere adeguato per il test molecolare se almeno uno degli esoni presentava la mutazione, o se entrambi gli esoni sono risultati wilde – type.

RISULTATI

Il sequenziamento genico diretto ha rilevato mutazioni a carico degli esoni 19 e 21 di EGFR in 6 su 58 casi (10.3%). In 4 casi le mutazioni erano a carico dell'esone 19 (n = 3 E746_A750del; n = 1 L747_A750del) e in due casi a carico dell'esone 21 (n = 2 L858R). Tutte queste mutazioni sono state rilevate anche dalle altre tecniche utilizzate, che inoltre hanno consentito di rilevare altri quattro casi mutati. Come riportato in tabella 2, una delezione E746_A750 a carico dell'esone 19 è stata rilevata sia dall'HRMA che dal saggio per la lunghezza dei frammenti per il caso 44 (figura 4). In modo analogo, altre tre mutazioni L858R a carico dell'esone 21 (casi n. 17; n. 38; n. 42) sono state rilevate dall'HRMA e dal saggio TaqMan (figura 5). Solo dopo micro dissezione laser, il sequenziamento genico diretto è stato capace di identificare tutte le mutazioni identificate dalle altre tecniche utilizzate direttamente sul *cell – pellet*. In particolare, dopo microdissezione laser del campione da analizzare, tutte le tecniche hanno rilevato 5 delezioni a carico dell'esone 19 (n = 4 E746_A750del; n = 1 L747_A750del). Per quanto riguarda l'esone 21, la mutazione L858R è stata identificata in 5 casi. Lo stato mutazionale di tutti i campioni discrepanti analizzati è riportato in tabella 2.

DISCUSSIONE

Questo studio ci ha consentito di validare un approccio semplice e veloce per migliorare il test per la valutazione dello stato mutazionale di EGFR. La pratica clinica corrente prevede che il patologo esterno invii al centro che si occupa della valutazione dello stato mutazionale di EGFR un campione di archivio o un *cell – block* (14). In questo caso sono necessari molti passaggi che, invece, possono essere evitati seguendo l'approccio che abbiamo mostrato in questo studio. Infatti la procedura che abbiamo validato, permette di omettere la valutazione microscopica del campione per stabilirne l'adeguatezza, evita la preparazione del campione per l'estrazione del DNA, sia per quanto riguarda l'allestimento di sezioni per il *cell – block* o la rimozione del coprioggetto per i campioni citologici di archivio, evita inoltre le procedure di microdissezione, manuali o laser, per arricchire la componente neoplastica. Tutti i passaggi appena illustrati comportano un dispendio di tempo ed un aumento di costi, richiedendo personale dedicato per la loro esecuzione. Quindi per rilevare in modo affidabile lo stato mutazionale degli esoni 19 e 21 di EGFR, possiamo seguire due approcci differenti; uno basato sul sequenziamento genico diretto dopo micro dissezione laser della componente neoplastica, l'altro prevede l'uso di tecniche più sensibili evitando l'arricchimento della componente neoplastica. Noi con questo studio abbiamo dimostrato che entrambi gli approcci sono applicabili alla citologia su strato sottile. Il rate globale di mutati per EGFR è del 17.2%; Questo suggerisce che i nostri metodi sono molto sensibili, mentre la loro specificità è dimostrata dalla concordanza ottenuta nei duplicati degli esperimenti. A questo punto diventa necessario verificare se l'elevata sensibilità analitica delle tecniche implementate in questo studio corrisponde ad una adeguata sensibilità clinica.

Validazione clinica del “fragment assay” per la rilevazione delle delezioni dell’esone 19 e della “Real Time PCR” con sonde TaqMan per le mutazioni dell’esone 21 di EGFR.

Uno degli aspetti fondamentali di un processo di validazione di tecnologie adoperate nella selezione dei pazienti da sottoporre ad uno specifico trattamento farmacologico è la valutazione della sensibilità clinica. Seguendo tale esigenza, dopo aver accertato la validità analitica delle tecniche implementate, abbiamo disegnato uno studio che ci consentisse di verificarne la sensibilità clinica.

METODI

Casistica

Nel periodo compreso tra Luglio 2010 e Luglio 2012, abbiamo ricevuto 682 richieste consecutive per l’analisi mutazionale di EGFR relative a pazienti con tumori polmonari in stage IIIB o IV (TNM), con una età compresa tra i 29 e gli 86 anni (media 59 anni). Dopo aver ottenuto il consenso informato da ogni singolo paziente, gli oncologi ed i patologi delle 12 differenti strutture richiedenti hanno provveduto ad inserire i dati relativi alla clinica ed alla patologia (compreso il referto anatomo – patologico), su di una piattaforma web dedicata a tale scopo (www.egfrfastnet.it). In seguito, il campione biologico relativo ad ogni paziente è stato spedito con urgenza presso il nostro centro. Una volta ricevuto il campione, le informazioni relative alla microscopia ed alla immunocitochimica contenute nel referto del patologo richiedente sono state standardizzate secondo le linee guida della “*International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society*” (vedi tabella 3) (22). Brevemente, i casi in cui le tecniche ancillari sono state cruciali per la subtipizzazione, sono stati classificati come “NSCLC *favor* adenocarcinoma” o “NSCLC *favor* carcinoma a cellule squamose”. Gli anticorpi più utilizzati dai patologi dei

centri richiedenti erano TTF-1 (Dako, clone 8G7G3/1, Milan, Italy) come *marker* per l'adenocarcinoma e p63 (Ventana, clone 4A4, Tucson, Arizona, USA) come *marker* per il carcinoma squamoso. L'abitudine al fumo è stata classificata secondo quanto segue: fumatore > 100 sigarette durante la vita; non fumatore < 100 sigarette durante la vita. Un solo campione tumorale, sia esso citologico o istologico, è stato testato per ogni paziente. I campioni citologici (n= 364) o istologici (n=318) sono stati ricevuti in una proporzione simile (53% vs 47%). I campioni istologici comprendevano sia resezioni chirurgiche (n=52) o piccole biopsie (n=266), mentre i campioni citologici includevano 274 ago aspirati, 31 prelievi transbronchiali, 30 effusioni, 27 lavaggi bronchiali e 2 espettorati.

Valutazione dello stato mutazionale di EGFR

La valutazione dello stato mutazionale dell'esone 19 di EGFR è stata valutata mediante il saggio per l'analisi della lunghezza dei frammenti, mentre la valutazione della mutazione dell'esone 21 è stata valutata mediante un saggio in Real Time Pcr con sonde Taqman. (20 – 21)

Valutazione dell'outcome terapeutico

Per la valutazione dell'outcome terapeutico, abbiamo selezionato i pazienti secondo i seguenti criteri di inclusione: (1) presenza di una mutazione a carico dell'esone 19 o 21 di EGFR; (2) somministrazione di gefitinib durante il corso della malattia; (3) disponibilità di un *follow-up* di almeno tre mesi. Tali criteri di inclusione ci hanno consentito di selezionare una popolazione di 26 pazienti (15 uomini ed 11 donne; età media = 54 anni). L'efficacia terapeutica del TKI nei pazienti per i quali la mutazione di EGFR è stata rilevata a partire da un campione citologico (n=13) è stata comparata con quella dei pazienti per i quali la determinazione dello stato mutazionale di EGFR è avvenuta a partire da un campione

istologico (n=13). La somministrazione di gefitinib è stata effettuata in prima linea per 16 pazienti, in seconda linea per 6 pazienti e solo per 4 pazienti la somministrazione è stata effettuata in linee di trattamento superiori alla seconda. In particolare, per i pazienti con a disposizione il campione istologico disponevamo di 7 trattamenti in prima linea, 3 in seconda e 3 in linee superiori alla seconda. Mentre per il gruppo di pazienti con campione citologico, 9 sono stati trattati in prima linea, 3 in seconda ed uno in linee superiori alla seconda. Il *follow-up* medio è stato di 12 mesi (con un range compreso tra 3 e 34 mesi). In tutti i pazienti, le rivalutazioni della patologia sono state effettuate mediante una TC *total body*. Il *Response rate* (RR) è stato valutato basandosi sui “*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*” (RECIST) (23). La *Progression-free survival* è stata calcolata dall’inizio del trattamento con gefitinib, alla data di progressione o morte per qualsiasi causa. I dati ricavati sono mostrati come curve di Kaplan - Meyer. Un valore di *p* minore o uguale a 0.05 è stato considerato statisticamente significativo. Tutte le analisi statistiche sono state condotte mediante la *suite* IBM SPSS Statistics 18 *software package* (SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

RISULTATI

Rate di mutati per EGFR

L’87.8% (599 di 682) dei campioni pervenutici sono risultati adeguati per la rilevazione dello stato mutazionale di EGFR, questi comprendevano 294 istologici e 305 citologici. La percentuale di inadeguati è stata del 7.5% (n=24/318) per i campioni istologici (tutti gli inadeguati erano biopsie) e del 16.2% (59/364) per i citologici. I metodi di campionamento per ognuno dei campioni citologici risultati inadeguati è riportato nella tabella 4. Per il DNA estratto da una sola biopsia istologica non siamo riusciti ad ottenere una amplificazione adeguata. Sul totale dei campioni l’8.7% (52/598) ha mostrato una mutazione a carico di

EGFR (34 delezioni dell'esone 19 e 18 mutazioni L858R dell'esone 21). In due campioni, le delezioni rilevate dal saggio per l'analisi dei frammenti e confermate dopo clonaggio dei prodotti di PCR (come riportato precedentemente), corrispondevano ad elettroferogrammi wild-type al sequenziamento genico diretto (figura 7). Come riportato nella tabella 5, la frequenza delle mutazioni è risultata essere maggiore nelle donne (32/599; $p=0.0001$) e nei non fumatori (42/599; $p=0.03$). Inoltre la presenza di una mutazione è associata all'istotipo ADC (48/599; $p=0.007$) diagnosticato solo tramite analisi morfologica al microscopio del preparato (80.7%; 42 di 52 cases) o assistita dall'immunocitochimica (11.5%; 6 di 52; NSCLC-favor ADC). Tre campioni (5.7%) risultati mutati erano NSCLC- NAS ed un solo caso mutato (1.9%) è stato diagnosticato come NSCLC-favor SCC.

Mutati di EGFR e tipologia di campioni

Le caratteristiche della popolazione analizzata, in termini di sesso ($p=0.12$), abitudine al fumo ($p=0.5$) ed istotipo ADC ($p=0.08$) non presentavano differenze statisticamente significative tra i pazienti che avevano ricevuto una diagnosi su campione citologico rispetto a quelli che disponevano di un istologico (tabella 3). Mentre la percentuale di NAS tra citologici (14%) ed istologici (7%) presentava una differenza significativa in termini statistici ($p=0.003$). La percentuale di campioni mutati è risultata essere simile tra campioni istologici (8.5%, 25 su 293) e citologici (8.8%, 27 su 305). Anche la distribuzione delle mutazioni rilevate è risultata essere simile in termini di sesso ($p=0.52$), abitudine al fumo ($p=0.31$) e sub tipizzazione istologica ($p=0.08$) tra i campioni istologici e citologici.

Outcome dei pazienti trattati con gefitinib

La maggior parte dei pazienti ha risposto al trattamento con gefitinib a prescindere se la selezione fosse stata effettuata a partire da un campione istologico o citologico. In particolare

15 pazienti (7 selezionati a partire da un campione istologico ed 8 da un campione citologico) hanno mostrato una risposta parziale al trattamento con gefitinib secondo i criteri RECIST; questi includevano i due pazienti per i quali la mutazione a carico dell'esone 19 di EGFR era stata rilevata solo dal saggio per l'analisi dei frammenti e non dal sequenziamento genico diretto (figura 7). In 10 pazienti su 26 si è ottenuta come migliore risposta una stabilità di malattia. Un solo paziente, la cui mutazione a carico di EGFR è stata rilevata a partire da un campione istologico ha mostrato una progressione di malattia alla prima rivalutazione. Il tasso di controllo globale della malattia, che comprende le risposte parziali e le stabilità di malattia, è risultato essere del 96% (25/26 pazienti). Come mostrato in figura 8 la PFS non presenta differenze tra i pazienti selezionati a partire da un campione istologico (9.2 mesi) o citologico (8.6 months).

DISCUSSIONE

Questo studio dimostra che la rilevazione delle mutazioni a carico di EGFR effettuata da un laboratorio centralizzato su campioni citologici ed adoperando metodologie ad elevate sensibilità predice la risposta al trattamento con TKI dei pazienti affetti da NSCLC, in modo paragonabile a quanto ottenuto partendo da campioni istologici. infatti, per i pazienti il cui test è stato effettuato su campione istologico il RR è risultato essere del 54% con una PFS di 9.2 mesi. In modo analogo, per i pazienti selezionati a partire da un campione citologico il RR è risultato del 62% e la PFS di 8.6 mesi. Studi precedenti hanno dimostrato che con l'ausilio di tecniche ad elevate sensibilità è possibile riscontrare una mutazione di EGFR anche su campioni citologici con una scarsa componente cellulare(9 - 11). Il nostro studio dimostra, in aggiunta, che rilevare una mutazione di EGFR su di un campione citologico con una scarsa componente cellulare, adoperando tecniche di biologia molecolare con una sensibilità superiore a quella del sequenziamento genico diretto, predice in modo affidabile la risposta al

trattamento con gefitinib. L'esternalizzazione del test per EGFR comporta un elevato tasso di campioni inadeguati. Anche nell'esperienza riportata da Pang et al (16), il tasso di inadeguati è del 10%. Questo persiste anche quando si utilizzano tecnologie ad elevata sensibilità (TheraScreen EGFR29 kit), come mostrato da Allegrini et al (17) che rilevano un tasso di inadeguati del 14%. Anche nella nostra esperienza, pur adoperando tecniche che richiedono solo 25 cellule neoplastiche per effettuare l'analisi, abbiamo rilevato un tasso di inadeguati del 16% per i campioni citologici. Per diminuire il tasso di campioni inadeguati il (cito)patologo dell'istituzione che richiede il test, dovrebbe essere coinvolto in modo più profondo nel processo diagnostico molecolare. Ancora oggi non è sottolineata l'importanza di partire da una citopreparazione adeguata. Partendo da tale presupposto, il campione citologico presenta dei vantaggi rispetto a quello istologico, soprattutto in termini di qualità del DNA estratto. Il disegno di questo nostro studio è simile a quello di Oshita et al (24) e Lozano et al. (17) Il primo gruppo riporta un RR del 91% RR negli 11 pazienti selezionati a partire da un campione citologico, mentre Lozano et al riportano un RR del 75% ed una PFS di 12.3 mesi in un gruppo di 16 pazienti. Detto questo, bisogna chiarire che il nostro approccio differisce dai due appena menzionati, almeno in due aspetti. Per prima cosa, i nostri campioni giungono tutti da istituzioni esterne; in seconda istanza, i nostri due gruppi di pazienti sono stati selezionati adoperando le stesse tecniche molecolari e sono stati trattati entrambi con gefitinib; l'unica differenza tra i due gruppi dei nostri pazienti era il campione di partenza (citologico o istologico). Come precedentemente riportato, in due dei campioni testati, la mutazione a carico dell'esone 19 di EGFR è stata rilevata solo dal saggio per l'analisi della lunghezza dei frammenti e non dal sequenziamento genico diretto (figura 7). Spesso accade che i metodi con differente sensibilità non siano concordanti nel rilevare le alterazioni a carico del DNA. In studi precedenti, le mutazioni di EGFR rilevate tramite *mutant-enriched PCR* in versmaneti pleurici, non venivano riscontrate da tecniche con una sensibilità inferiore. Si

conosce ancora poco circa l'*outcome* dei pazienti per i quali la mutazione è riscontrata in modo discordante da tecniche con differente sensibilità. Per quanto concerne i nostri due casi, entrambi hanno mostrato una risposta parziale al trattamento con gefitinib. Pertanto è concepibile che il trattamento con gefitinib sia efficace anche quando la mutazione è rilevata con tecniche ad elevata sensibilità su campioni che presentano un numero limitato di cellule neoplastiche. Però è chiaro che sono necessari studi prospettici randomizzati per determinare la relazione tra eterogeneità genetica delle mutazioni di EGFR, tecnologie adoperate ed efficacia del trattamento con TKI. Concludendo, possiamo affermare che questo studio oltre ad aver validato la sensibilità clinica delle tecnologie ad elevata sensibilità sviluppate nel corso dei nostri lavori precedenti offre ai pazienti, gli oncologi ed i patologi richiedenti il test per EGFR dei dati in grado di dimostrare che la rilevazione delle mutazioni di EGFR a partire da campioni citologici predice l'efficacia terapeutica del gefitinib in modo affidabile e paragonabile ai risultati che si ottengono quando la selezione viene effettuata a partire da campioni istologici.

CAPITOLO 2:

Il ruolo di KRAS nella terapia biologica del carcinoma del colon – retto metastatico (CRCm)

In Europa il tumore del colon-retto (CRC) rappresenta la terza neoplasia più frequente nel sesso maschile e la seconda nelle donne (25). Circa il 25/30% dei pazienti con tale neoplasia è in fase metastatica alla diagnosi (26), ed il 15-25% presenta metastasi epatiche; in questi pazienti la resezione chirurgica costituisce l'unica opzione terapeutica curativa con percentuale di sopravvivenza a 5 anni del 28-39%. Tuttavia l'80-90% dei casi non sono resecabili e pertanto il trattamento di scelta è la chemioterapia sistemica (27,28). Cetuximab e panitumumab, anticorpi monoclonali anti-EGFR, si sono dimostrati attivi nel trattamento dei pazienti refrattari a 5-fluorouracile, irinotecano e oxaliplatino, migliorando il tempo libero da progressione (PFS) e la sopravvivenza globale (OS) (29,30,31). L'EGFR è un recettore transmembrana appartenente ad una famiglia di 4 proteine correlate (32); dieci differenti ligandi possono legarsi in maniera selettiva ad ogni recettore, conducendo alla formazione di un dimero che provoca l'autofosforilazione del recettore mediante attività tirosinchinasica (33). L'autofosforilazione scatena una serie di segnali intracellulari che si traducono nella proliferazione cellulare, nel blocco dell'apoptosi, nell'attivazione della capacità di invasione e nella stimolazione dell'angiogenesi (34). Il cetuximab si lega al dominio extracellulare dell'EGFR quando è nella configurazione inattiva, compete per il legame con il recettore occupando il sito di legame e, pertanto, blocca l'attivazione tirosinchinasica dell'EGFR indotta dal ligando (35,36). Il legame dell'anticorpo stimola l'internalizzazione del recettore e la sua degradazione (37,38), e può inoltre scatenare una reazione antitumorale citotossica cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC) (39,40). KRAS, una piccola proteina (21 KDa) monomerica legante il GTP localizzata a valle dell'EGFR, è una componente essenziale del

suo pathway di trasduzione. KRAS può subire mutazioni attivanti nei codoni 12 o 13 dell'esone 2, isolando in tal modo la cascata dagli effetti dell'EGFR e rendendo inefficace la sua inibizione (41). In presenza di mutazioni del gene KRAS, cetuximab ed panitumumab non sono efficaci ed hanno un potenziale effetto detrimentalmente (42). E' per questo motivo che le autorità regolatorie in USA e in Europa hanno limitato l'indicazione al trattamento con cetuximab o panitumumab per i pazienti con tumore del colon-retto wild-type per i codoni 12 e 13 dell'esone 2 del gene KRAS (43). L'analisi dello stato mutazionale del gene KRAS può essere effettuata mediante metodiche differenti, ognuna delle quali ha i suoi limiti di sensibilità. Ad oggi non esistono raccomandazioni da parte dell'FDA o dell'EMA in merito al tipo di metodica da utilizzare (44). Il sequenziamento diretto rappresenta il metodo più utilizzato, ma è dotato di una bassa sensibilità: infatti necessita di 20 alleli mutati su una popolazione di 100 alleli totali affinché possa rilevare un'alterazione genica. Tuttavia, in campioni adeguati per numero di cellule neoplastiche portatrici di alterazioni geniche, il sequenziamento diretto può essere considerato una metodica attendibile. Al contrario, quando le cellule tumorali mutate sono scarsamente rappresentate dopo microdissezioni tissutali selettive, le mutazioni di KRAS possono essere misconosciute, generando dei falsi negativi (45). Anche l'eterogeneità intratumorale di KRAS ha il suo ruolo: le mutazioni si verificano in maniera eterogenea, nelle parti centrali del tumore o nella sua periferia o anche in diverse sezioni del tumore (46,47). Tutto questo riveste la sua importanza ai fini dell'identificazione dei pazienti non rispondenti a cetuximab: studi recenti hanno infatti dimostrato che, quando la quantità di cellule tumorali mutate all'interno del campione è esigua, il cetuximab non risulta essere efficace (48,49).

Implementazione e validazione del sequenziamento genico diretto per la rilevazione delle mutazioni a carico dei codoni 12 e 13 dell'esone 2 di KRAS.

Casistica

Nel periodo compreso tra Febbraio 2009 e Gennaio 2012, ci sono giunte 1720 richieste per la valutazione dello stato mutazionale di KRAS per selezionare alla terapia con Anticorpi monoclonali (MoAb) diretti contro EGFR 960 uomini e 760 donne con carcinoma del colon retto metastatico (CRCm). L'età media dei pazienti è risultata essere di 67 anni (compresa tra 31 e 96 anni). Un solo campione tumorale è stato testato per ogni paziente (1609 tumori primitivi; 111 metastasi). Solo in un sottogruppo di 30 pazienti, per i quali avevamo a disposizione sia il tumore primitivo che una metastasi a distanza, è stato valutato lo stato mutazionale di KRAS in entrambi i prelievi. Tutti i campioni processati erano fissati in formalina ed inclusi in paraffina. Globalmente, 406 campioni (23.6%) ci sono stati inviati dall'unità di patologia gastrointestinale, mentre 1314 (76.4%) campioni li abbiamo ricevuti da 18 dipartimenti di patologia esterni. Attraverso una piattaforma web dedicata (www.krasactive.it) e dopo aver ottenuto il consenso informato dei pazienti, l'oncologo ed il patologo richiedenti il test hanno inserito rispettivamente i dati relativi alla clinica ed alla patologia. Dopodichè, il tessuto corrispondente è stato inviato al nostro laboratorio. Le informazioni relative allo stadio tumorale (sec. Unio Internationale Contra Cancrum) erano disponibili in 1666 casi. In 899 (53.9%) casi il tumore era in stadio IV; meno frequentemente (n=767; 46.1%) il tumore era in stadio I, II (n=496) o III (n=271). Le informazioni relative alla tipologia del campione erano disponibili in 1427 casi (1263 resezioni chirurgiche, 88.5%; 164 biopsie, 11.5%).

Il 1095 casi disponevamo delle informazioni relative alla fissazione. In 905 (82.6%) casi come fissativo è stata utilizzata la formalina neutral tamponata al 10% ed è stato monitorato attentamente il period di incubazione, in modo da verificare che non superasse le 24h. In 190 (17.4%) casi, invece, la fissazione è avvenuta con formalina non tamponata.

Validazione del sequenziamento genico diretto per l'esone 2 di KRAS

Prima dell'introduzione nella pratica clinica, abbiamo utilizzato il DNA estratto dalle linee cellulari SW480 (con mutazione G12V), LoVo (con mutazione G13D) ed OVOCAR (KRAS WT) per standardizzare la procedura di sequenziamento dell'esone 2 di KRAS. Inoltre abbiamo testato 8 campioni, di cui 4 erano mutati e quattro wilde – type, precedentemente testati da un laboratorio accreditato per le genotipizzazioni. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in duplicato ed hanno dato i risultati attesi. Per verificare il livello minimo di rilevazione dell'allele mutato, abbiamo analizzato delle diluizioni seriali (50%, 30%, 20%, 10% and 5%) di allele mutato (SW480 and LoVo) e WT (OVOCAR). Come mostrato in figura 9, il limite di rilevazione della nostra tecnica è risultato essere del 10% di allele mutato. Di conseguenza, il limite minimo di cellule neoplastiche che il campione deve presentare per essere giudicato adeguato era del 20%. Tutta la serie riportata è stata analizzato second la procedura seguente. In ogni singolo caso il DNA è stato estratto utilizzando il DNA minikit (Qiagen, Milano, Italia), seguendo le istruzioni del costruttore. Un frammento di 220-bp dell'esone 2 di KRAS, contenente i codoni 12 e 13, è stato amplificato mediante PCR con i seguenti primers: KRAS F :5–GGTGGAGTATTTGATAGT GTATTAACC–3 e KRAS R: 5–AGAATGGTCCTGCACCAGTAA–3, disegnati a partire dalla sequenza di riferimento NM_004985 della GenBank (NCBI) utilizzando i software OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). La concentrazione dei reagenti da utilizzare per l'amplificazione è stata ottimizzata per 20ng di DNA ed è la seguente: 0.4

mM di ogni primer e 0.5 U di Taq Polimerasi 5 PRIME (5 PRIME; Eppendorf, Milano, Italia) in un volume totale di 25 µl. Il protocollo termico utilizzato prevedeva: una fase iniziale di denaturazione per 5 min a 95°C, una denaturazione ciclica a 94°C per 30 s, l'annealing a 57°C per 30 s, una estensione a 65°C per 30 s per 35 cicli ed una estensione finale a 72°C per 2 min. Dopo l'amplificazione i frammenti sono stati purificati con il QiaQuick DNA purification kit (Qiagen, Crawley, West Sussex, UK) seguendo le istruzioni del costruttore. Le reazioni di sequenziamento sono state eseguite sia per il frammento senso che per quello antisenso utilizzando il Big Dye Terminator v1.1 (Applied Biosystems, Monza, Italia) utilizzando 10 ng di DNA amplificato e purificato. La purificazione dei prodotti marcati con fluorocromi è avvenuta tramite precipitazione con etanolo ed EDTA 125µM ed i prodotti marcati e purificati sono stati analizzati con l'analizzatore genetico Applied Biosystems 310. Gli elettroferogrammi ottenuti dalle relative corse sono stati allineati ed esaminati per rilevare lo stato mutazionale dei codoni 12 e 13 di KRAS con il software CodonCode. In 578 casi è stato possibile rivedere con attenzione le relazioni esistenti tra la percentuale di cellule neoplastiche del campione analizzato ed il rate di mutati per KRAS. Basandosi sui dati di validazione riportati in precedenza, I campioni che mostravano una percentuale di cellule neoplastiche inferior al 30% sono stati rianalizzati utilizzando un saggio real time based (TheraScreen K-RAS mutation kit, DxS Ltd, Manchester, Inghilterra) seguendo le istruzioni del costruttore.

Valutazione della risposta al trattamento

Allo scopo di valutare il valore predittivo del sequenziamento genico diretto, partendo da una serie di 406 campioni, inviatici dall'unità di patologia gastrointestinale della nostra istituzione, abbiamo selezionato 50 pazienti trattati con MoAb diretti contro EGFR, adoperando i seguenti criteri di inclusione: (1) presenza di una metastasi inoperabile; (2)

assenza di mutazioni a carico dei codoni 12 e 13 di KRAS; e (3) almeno una linea di trattamento chemioterapico. Dei 50 pazienti selezionati, 35 erano uomini e 15 donne, con una età media di 61 anni (compresa tra 29 e 77). Il Cetuximab è stato amministrato con una dose iniziale di carico a 400 mg/m² seguita da infusioni settimanali di 250 mg/m² durante tutto il corso del trattamento, sino all'insorgenza di una tossicità inaccettabile oppure ad una documentata progressione di malattia. L'evoluzione della patologia in ogni paziente è stata valutata mediante una TC total body prima dell'inizio del trattamento e a seguire ogni due mesi. Il response rate (RR) è stato valutato secondo i criteri RECIST (V.2.0) (23). Sulla base dell'RR, abbiamo classificato i pazienti come rispondenti (risposta parziale o completa) e non rispondenti (stabilità di malattia o progressione). Inoltre abbiamo considerato il rate di controllo della malattia (risposte complete, risposte parziali e stabilità di malattia). La progressione libera da malattia (PFS) è stata definita come il tempo che intercorre dalla prima somministrazione di Cetuximab sino all'evidenza di una progressione o alla morte del paziente per qualsiasi causa. La sopravvivenza globale (OS) è stata definita come il tempo che intercorre tra la prima somministrazione di cetuximab e la morte del paziente per ogni causa o la data in cui l'oncologo ha incontrato per l'ultima volta il paziente.

Analisi statistiche

Tutte le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il Fisher's test con la suite IBM SPSS Statistics 18 package. Un valore *p* uguale o inferiore a 0.05 è stato considerato come significativo.

RISULTATI

Distribuzione delle mutazioni

La rilevazione dello stato mutazionale dei codoni 12 e 13 di KRAS è stata condotta con successo in 1691 (98.3%) campioni. In 29 (1.7%) casi, invece, non è stato possibile portare a termine l'esame per una insufficiente quantità di tessuto inviataci.

In 671 (39.6%) casi abbiamo riscontrato una mutazione a carico di uno dei due codoni analizzati. Considerando tutta la serie di campioni analizzati, non sono emerse relazioni statisticamente significative circa l'età ($p=0.2$) o il sesso, con un percentuale di mutazioni nel 40.9% delle donne ed il 38.6% degli uomini ($p=0.2$). Riguardo al numero totale di mutazioni, il 78% (523/671) sono state rilevate nel codone 12 (GGT) ed il 22% (148/671) nel codone 13 (GGC). In particolare, le mutazioni più frequenti per il codone 12 sono risultate la GAT (29.8%) che porta alla sostituzione della glicina con un acido aspartico e la mutazione GTT (25.5%) che porta alla sostituzione con una valina. Per quanto riguarda il codone 13 la mutazione più frequente è risultata la GAC (21.3%), che porta alla sostituzione della glicina con l'acido aspartico. La frequenza di tutte le mutazioni, comprese quelle meno comuni è riportata nella tabella 6.

Tipologia di campione e percentuale di mutazioni rilevate

La percentuale di mutazioni rilevate è risultata essere simile tra le resezioni chirurgiche e le biopsie endoscopiche (40% vs 43%; $p=0.3$). Allo stesso modo, anche la distribuzione delle mutazioni è sovrapponibile tra i due gruppi di campioni differenti, come riportato in tabella 6. Una differenza è stata invece rilevata nella percentuale di inadeguati tra le biopsie (8.0%) e le resezioni chirurgiche (0.6%).

Percentuale di mutazioni rilevate nei campioni di tumori primitivi e di metastasi a distanza

Nella nostra serie di 1720 campioni, la valutazione dello stato mutazionale di KRAS è avvenuta per un solo campione tissutale. La distribuzione delle mutazioni non è risultata essere differente tra i tumori primitivi e le metastasi, come riportato in tabella 6. Mentre nei tumori primitivi (n=1609) la percentuale di mutazioni rilevate è risultata essere del 39%; nelle metastasi (n=111) era del 50%. La differenza rilevata è statisticamente significativa ($p=0.02$). Inoltre, è stato possibile valutare lo stato mutazionale di KRAS in tumori primitivi e metastatici derivanti dallo stesso paziente in un subset di 30 casi per i quali entrambi i campioni, primitivi e metastasi, erano presenti negli archivi della nostra anatomia patologica. In 4 casi (13.4%) abbiamo ottenuto un risultato discordante. In tutti i casi, le mutazioni rilevate (n=1 G12C, n=1 G12D, n=1 G12S ed n=1 G12R) erano presenti nelle metastasi, mentre il tumore primitivo è risultato essere wild – type.

Rate di mutati e percentuale di cellule neoplastiche

La relazione tra il rate di mutati in KRAS e la percentuale di cellule neoplastiche è stata analizzata in un subset di 578 campioni. In 528 (91.3%) casi la percentuale di cellule neoplastiche è risultata superiore al 30%, mentre in 50 (8.7%) casi è risultata inferiore al 30%. Il rate di mutati per KRAS rilevato al sequenziamento genico diretto è risultato essere significativamente ($p=0.02$) più basso (26.7% vs 43.4%) nel gruppo con una percentuale di cellule neoplastiche inferiore al 30%. Rianalizzando quest'ultimo gruppo con il TheraScreen K-RAS *mutation kit* tutte le 13 mutazioni rilevate dal sequenziamento sono state confermate e ed in più abbiamo rilevato altri sei casi mutati, portando la percentuale totale di mutati al 38%.

Percentuale di mutati e stadio tumorale

Il rate di campioni mutati è stato correlato alle varie classi di stadio tumorali. Il rate di mutati è risultato essere il 35.9% per gli stadi I–II, il 38% per lo stadio III ed il 41.8 per lo stadio IV. La differenza nel rate di mutati tra gli stadi non metastatici (I–III) e quelli metastatici (stage IV) è risultata essere statisticamente significativa ($p=0.05$).

Rate di mutati e modalità di fissazione dei campioni

Il rate di mutati nei campioni fissati in formalina tamponata è risultato del 40.9%, mentre era del 34.9% per i campioni fissati in formalina non tamponata. Tale differenza non è risultata statisticamente significativa ($p=0.08$).

Valutazione del rate di risposta

Venticinque pazienti hanno ricevuto un trattamento con cetuximab ed irinotecano, altri 25 hanno ricevuto un trattamento di associazione (22 FOLFIRI e 3 FOLFOX). Ventotto pazienti sono stati trattati in seconda linea e 22 in terza (tabella 7). Il tasso di risposte al trattamento è stato del 26% (13 su 50 pazienti); in particolare, abbiamo rilevato una (2%) risposta completa e 12 (24%) parziali. Altri 27 (74%) pazienti, invece, non hanno mostrato alcuna risposta; 22 su 50 hanno presentato una progressione come migliore risposta. Il 30% dei pazienti è andato in stabilità di malattia. Il rate di controllo di malattia (risposte obiettive e stabilità di malattia) è stato del 56% (tabella 8). Per quanto riguarda la sopravvivenza, la PFS media è stata di 4.4 mesi e l'OS è risultata di 10.4 mesi.

DISCUSSIONE

E' ormai consolidato che il sequenziamento genico diretto ha una sensibilità limitata per la rilevazione delle mutazioni di KRAS. Ma l'adeguatezza di ogni campione va definita caso per

caso da un'attenta analisi microscopica del campione. Ad oggi, l'unico criterio adottato è la percentuale di cellule neoplastiche. Studi precedenti hanno dimostrato che il sequenziamento genico diretto è equivalente a tecniche più sensibili quando impiegato per campioni con una percentuale di cellule neoplastiche superiore al 30%. (45) Evidenza che abbiamo confermato anche nella nostra esperienza ($p=0.02$). Al contrario, per campioni con una percentuale di cellule neoplastiche inferiore al 30%, tecniche più sensibili come il TheraScreen kit incrementano la percentuale di mutati rilevati del 12%.

Inoltre, con il nostro lavoro, abbiamo dimostrato che la performance del sequenziamento può essere influenzata da altri due criteri: il sito e lo stadio del tumore. Il rate di mutati ottenuto testando un solo campione tumorale per i 1720 pazienti analizzati, presenta una differenza tra il gruppo dei 1609 tumori primitivi e le 111 metastasi. In particolare, il gruppo delle metastasi a distanza presentava una percentuale di mutati del 50%, rispetto al 39% dei tumori primitivi. Tale differenza ha mostrato una significatività statistica ($p=0.02$). Una discrepanza simile l'abbiamo rilevata dall'analisi dei tumori primitivi e delle corrispondenti metastasi derivanti da un subset di 30 pazienti presenti negli archivi della nostra anatomia patologica. Infatti, in 4 su 30 pazienti (13.4%), la mutazione è stata rilevata solo a carico della metastasi. Questa differenza potrebbe riflettere l'eterogeneità esistente tra il tumore primitivo ed il sito metastatico, ma può inoltre suggerire che nei campioni prelevati dai siti metastatici il sequenziamento genico diretto è tecnicamente più efficiente. In modo analogo, i tumori in stadio IV hanno mostrato una percentuale di mutati maggiore ($p=0.05$) rispetto a quelli appartenenti a stadi precoci. Quindi i campioni prelevati dai tumori primitivi di alto stadio o dai siti metastatici presentano una percentuale maggiore di mutazioni per KRAS al sequenziamento genico diretto, riflettendo probabilmente la maggiore percentuale di cellule tumorali mutate presenti in queste categorie di campioni. I nostri dati concorrono con la nozione che l'eterogeneità per le mutazioni di KRAS è un fenomeno più frequente nei tumori

di basso stadio. Infatti, le uniche discrepanze rilevate tra il sequenziamento genico diretto e le tecniche con sensibilità più elevate si sono avute in campioni di stadio I e II. Le linee guida della European Society of Pathology consigliano di effettuare il test per la rilevazione dello stato mutazionale di KRAS anche nei tumori di stadio I – III. I nostri dati indicano che il sequenziamento genico non è applicabile in questo setting. Altre ricerche sono necessarie per chiarire la migliore metodologia da adoperare in quest'ambito.

Le differenze nel rate di mutati rilevate in relazione all'età ($p=0.2$) al sesso ($p=0.2$), tra le resezioni chirurgiche e le biopsie endoscopiche ($p=0.3$) ed in relazione alle modalità di fissazione ($p=0.08$), non sono risultate statisticamente significative.

Studi precedenti hanno riportato un RR ai MoAb anti-EGFR variabile tra il 10% ed il 20% nei pazienti con mCRC. (48,49) I nostri dati mostrano che 13 (26%) su 50 pazienti KRAS WT hanno mostrato una risposta al trattamento, quindi il nostro saggio basato sul sequenziamento genico diretto predice affidabilmente la risposta al trattamento con cetuximab dei pazienti affetti da mCRC wild – type per KRAS. Tale efficienza è dovuta ad una revisione attenta dei casi con una percentuale di cellule neoplastica superiore al 30%. In conclusione, i nostri dati derivanti dall'analisi della serie più ampia presente in letteratura, circa la valutazione dello stato mutazionale di KRAS a scopo predittivo risultano utili alla pratica clinica dei patologi impegnati in questa tipologia di determinazioni. Infatti, oltre alla percentuale di cellule neoplastiche, ora il patologo ha a disposizione altri due criteri per la valutazione dell'adeguatezza di un campione da sottoporre al sequenziamento genico diretto. Infatti il sequenziamento genico diretto risulta più efficiente nei campioni prelevati da tumori di alto grado o da siti metastatici.

Sviluppo e validazione clinica dell' "High Resolution Melting Analysis" per la rilevazione di mutazioni a carico di KRAS.

Per incrementare la sensibilità analitica e ridurre i problemi relativi alla generazione di falsi negativi soprattutto per i tumori di basso grado ed i primitivi, abbiamo deciso di validare sia analiticamente che clinicamente una tecnologia basata sull'analisi degli etero duplex di DNA in Real Time Pcr (50).

METODI

Pazienti

Abbiamo selezionato retrospettivamente un gruppo di pazienti secondo i seguenti criteri:

- Diagnosi istologica di adenocarcinoma del colon-retto;
- Metastasi non resecabili;
- Stato wild-type dell'esone 2 dei codoni 12 e 13 di KRAS al sequenziamento diretto;
- Almeno una linea di chemioterapia prima del trattamento con cetuximab;
- Disponibilità di una quantità sufficiente di DNA genomico (>200 ng) estratto da un'area contenente almeno il 50% di cellule neoplastiche, confermato come KRAS wild-type al sequenziamento diretto.

Le caratteristiche dei pazienti sono descritte nella tabella 9. In totale sono stati valutati 50 pazienti, 35 maschi e 15 donne, con un'età media di 61 anni. Tutti i pazienti hanno praticato una TAC total body prima dell'inizio della chemioterapia e successivamente ogni due mesi per valutare lo stato di malattia. Inoltre, in tutti sono state esaminate la funzionalità cardiaca, ematologica, epatica e renale prima del trattamento. Venticinque pazienti sono stati trattati con Irinotecano associato a cetuximab, gli altri 25 con uno schema di combinazione (22 FOLFIRI e 3 FOLFOX). In ventotto pazienti si trattava di una terapia di II linea, mentre in 22 di III linea. Cetuximab è stato somministrato, in associazione alla chemioterapia, alla dose

di carico di 400 mg /m² seguita da infusioni settimanali di 250 mg/m² fino a tossicità inaccettabile o progressione di malattia. Dopo l'approvazione del comitato etico interno, gli estratti di DNA di ciascun paziente sono stati esaminati con l'HRMA.

High Resolution Melting Analysis

La coppia di *primers* utilizzata (FW 5'- AGCCTGCTGAAAATGACTGA-3'; RV 5'- TTGGATCATATTCGTCCACCA-3') consente l'amplificazione di una breve (114 bp) regione genica di KRAS ed è già stata validata per l'uso in HRMA da precedenti studi [27,30,31]. Ogni singola reazione è allestita in un volume finale 20 µl in cui è contenuto 1X HRM Melt Doctor® Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) che comprende, come colorante intercalante il DNA, il SYTO 9 modificato, 400 nM di ogni primer e 10 ng di DNA genomico e acqua per biologia molecolare. Tutte le reazioni di PCR sono state condotte in duplicato. Le reazioni sono state preparate in piastre da 0.2 ml e corse con lo strumento 7500 fast Real-Time PCR (Applied Biosystems), secondo il seguente protocollo termico: 10 min a 95°C; 40 cicli, ognuno dei quali prevedeva 95°C per 15 s e 60°C per 1 min seguiti da 15s a 95°C ed una rampa termica da 60°C a 95°C con un incremento di 0.1°C al secondo.

Sensibilità dell'HRMA e interpretazione dei risultati

La capacità dell'HRMA di identificare la presenza di differenti alterazioni geniche è stata valutata sul DNA estratto da linee cellulari con mutazioni eterozigoti note di KRAS, in particolare sono state utilizzate le H441 e le HCT116 rispettivamente per il codone 12 di KRAS (G12V, eterozigote) e per il codone 13 (G13D, eterozigote). Inoltre, il DNA estratto dalla linea cellulare PC-9 (KRAS wild-type) è stato utilizzato come controllo negativo. Per

stabilire la sensibilità analitica dell'HRMA, il DNA estratto dalla linea cellulare H441 (G12V, eterozigote) è stato serialmente diluito (50%, 12.5% e 3%) con il DNA estratto dalla linea cellulare PC-9 (KRAS wild-type). Ogni diluizione ottenuta è stata analizzata sia con l'HRMA che con il sequenziamento diretto. Quest'ultimo è stato condotto come precedentemente descritto (19). I grafici normalizzati secondo la fluorescenza (normalized plots) e quelli normalizzati secondo il controllo negativo (difference plots), ottenuti dall'elaborazione dei dati con il Software 7500 fast Real-Time HRM v 2.0.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) sono stati utilizzati da un genetista molecolare ed un patologo molecolare per l'identificazione dello stato mutazionale di KRAS sia nelle linee cellulari che nei pazienti. I grafici normalizzati secondo la fluorescenza emessa sono stati ottenuti monitorando la dissociazione del colorante fluorescente dalla doppia elica di DNA all'aumentare della temperatura. Il colorante usato (SYTO-9 modificato) può emettere fluorescenza solo quando si intercala nella doppia elica di DNA. Il grafico normalizzato secondo la fluorescenza emessa mostra il grado di riduzione della fluorescenza al di sopra di un intervallo di temperatura (dai 60°C ai 95°C). Nei grafici normalizzati secondo il controllo negativo, il profilo di melting di ogni campione è stato normalizzato secondo il controllo negativo (KRAS wild-type). Deviazioni significative dalla linea orizzontale (che indica il controllo KRAS wild-type normalizzato verso se stesso) sono indicative di cambiamenti della sequenza degli ampliconi analizzati. I campioni con curve che presentavano tali caratteristiche sono stati registrati come mutati per KRAS all'HRMA (HRMA MUT).

Conferma dei campioni mutati all'HRMA

I prodotti della PCR che hanno mostrato un alterato profilo di melting sono stati ulteriormente esaminati per confermare lo stato mutazionale ed identificare il tipo di

mutazione. Pertanto sono stati clonati nel vettore TOPO TA (Invitrogen, CA, USA) secondo le istruzioni del produttore. Per ogni campione HRMA MUT sono stati purificati e sequenziati 30 plasmidi usando il BigDye Terminator kit (Applied Biosystems), e analizzati mediante ABI 3730 (Applied Biosystems) con primers M13 bidirezionali. I dati ottenuti dal sequenziamento sono stati analizzati con il software Mutation Surveyor (SoftGenetics, State College, Pa). I campioni sono stati classificati come HRMA mutati se almeno un clone presentava la mutazione. Per ognuno dei casi risultati KRAS HRMA MUT, l'ematossilina-eosina corrispondente al tessuto da cui è stato estratto il DNA è stata revisionata per verificare la percentuale di cellule tumorali presenti.

Valutazione dell'efficacia del trattamento

Tutti i pazienti sono stati considerati valutabili per la risposta al trattamento, la sopravvivenza libera da progressione (PFS) e la sopravvivenza globale (OS) rispetto al loro stato all'HRMA. Il tasso di risposta è stato valutato secondo i criteri RECIST (version 2.0). La sopravvivenza libera da progressione (PFS) è stata definita come l'intervallo tra la prima somministrazione di cetuximab e la prima evidenza di progressione di malattia o morte per ogni causa. La sopravvivenza globale (OS) è stata definita come l'intervallo tra la prima somministrazione di cetuximab e la morte per ogni causa.

Analisi statistica

Sulla base del tasso di risposta abbiamo classificato i pazienti in responders (risposta completa o parziale) e non responders (stabilità di malattia o progressione). Inoltre, abbiamo valutato la percentuale di controllo della malattia (risposta completa, risposta parziale,

stabilità di malattia). Il test di Fischer è stato utilizzato per correlare la risposta al trattamento allo stato di KRAS. PFS and OS sono state rappresentate con curve di Kaplan – Meier e le differenze tra i gruppi, definite in base allo stato di KRAS all'HRMA, sono state comparate con il log-rank test. Un livello di $p \leq 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo. Tutte le analisi sono state condotte utilizzando l'IBM SPSS Statistics 18 package software (SPSS Inc. Chicago, IL).

RISULTATI

Risultati dell'HRMA

L'HRMA è in grado di discriminare le mutazioni G12V (H441) e G13D (HCT116) dal DNA wild-type per KRAS (PC-9). La figura 10 mostra il difference plot generato dalle mutazioni G12V e G13D a carico dei codoni 12 e 13 dell'esone 2 di KRAS ed i corrispondenti elettroferogrammi. Per quanto riguarda la sensibilità del test, la figura 11 mostra i difference plots ottenuti dalle diluizioni del DNA della linea cellulare H441 con quello della linea cellulare PC-9 al 50%, 12,5% e 3%; come si può osservare, siamo stati in grado di rilevare fino al 3% di alleli mutati (G12V) in un background di DNA wild-type. Successivamente questo metodo è stato impiegato per determinare lo stato mutazionale dell'esone 2 di KRAS nei 50 pazienti selezionati. Sono stati individuati quattro pazienti (8%) con alterata curva di melting (figura 12). Poiché l'HRMA è un test di screening, i risultati devono essere confermati con un'altra metodica, nel nostro caso il sequenziamento del DNA estratto dai cloni prodotti con il frammento di 114bp amplificato durante l'HRMA. Ciò è necessario sia per identificare le alterazioni dei singoli nucleotidi, sia per escludere falsi positivi dovuti ad una curva anomala prodotta da una variante neutra. Secondo i

risultati ottenuti dal sequenziamento dei cloni (G12V n=2; G12D n=1 e G13D n=1), tutti i campioni che mostravano curve aberranti sono stati definiti mutati. La revisione microscopica delle ematossiline-eosina ha confermato in tutti i casi che il DNA è stato estratto da aree tissutali contenenti almeno il 50% di cellule tumorali, in assenza di necrosi.

Risposta al trattamento

La percentuale di risposta al trattamento è stata del 28.3% (13/46 pazienti) nel gruppo KRAS WT all'HRMA: in particolare, sono state osservate una risposta completa (2.2%) e 12 risposte parziali (26.1%). Al contrario, non è stata registrata nessuna risposta nei pazienti KRAS HRMA MUT; 3 su 4 hanno ottenuto una progressione di malattia come miglior risposta. Una stabilità di malattia è stata riscontrata nel 30.4% dei pazienti (14/46) e nel 25% (1/4) rispettivamente nei soggetti HRMA WT e MUT. Il tasso di controllo della malattia (risposte obiettive+stabilità di malattia) è stato del 58.7% nei pazienti HRMA WT e del 25% nei MUT. Non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa tra lo stato di KRAS all'HRMA e il tasso di risposta ($p=0.287$) o la percentuale di controllo della malattia ($p=0.219$).

Sopravvivenza

Come mostrato in figura 13, la PFS media è stata di 5.1 mesi per i pazienti HRMA WT e di 2.5 mesi per quelli HRMA MUT (HR=0.34, 95% CI 2.3-6.7, $p=0.04$). Come mostrato in figura 14, l'OS media è stata di 11,3 mesi nei soggetti HRMA WT verso 3,2 mesi in quelli HRMA MUT (HR=0.11, 95% CI 7.8-13.1, $p=0.03$).

DISCUSSIONE

In questo studio retrospettivo abbiamo analizzato mediante l'HRMA un considerevole numero di pazienti selezionati sulla base del sequenziamento diretto per effettuare una terapia di II o III linea con cetuximab. L'HRMA ha identificato 4/50 pazienti KRAS mutati, che non erano stati precedentemente individuati dal sequenziamento genico diretto. Tutti questi pazienti non avevano beneficiato del trattamento con cetuximab. Pertanto, se la strategia terapeutica fosse stata scelta in base ai risultati dell'HRMA, in una percentuale significativa di casi (8%) si sarebbe evitato un trattamento inutile, considerata l'assenza di beneficio clinico. Infatti, 3 di essi hanno ottenuto come migliore risposta una progressione di malattia e hanno presentato all'HRMA mutazioni nel codone 12 (2 G12V e 1 G12D), mentre il quarto paziente, per il quale è stata registrata una stabilità di malattia, è risultato portatore all'HRMA della mutazione G13D, che, nello studio di De Roock et al. (51), è stata associata a beneficio clinico (OS e PFS più lungo rispetto ad altri tipi di mutazioni). Inoltre, l'assenza di una correlazione statisticamente significativa tra il tasso di risposta e lo stato mutazionale di KRAS è probabilmente da imputare all'esiguo numero della popolazione in oggetto ed anche alla considerazione che, nell'ambito di essa, solo quattro pazienti hanno mostrato un profilo di melting alterato che indicava la presenza di una mutazione in KRAS. E' ragionevole che, aumentando il numero dei pazienti, la probabilità di riscontrare ulteriori casi KRAS mutati all'HRMA potrebbe incrementarsi. In letteratura sono stati già descritti risultati discordanti tra l'HRMA ed il sequenziamento diretto (52); Le difficoltà diagnostiche del sequenziamento diretto sono da imputare sia ad una bassa percentuale di cellule tumorali presenti nel campione (45) sia all'eventuale eterogeneità genetica intratumorale. (46,47) Gli esperimenti di validazione con diluizioni seriali del DNA estratto delle linee cellulari

tumorali mutate in KRAS e del DNA KRAS wild-type hanno mostrato che il sequenziamento diretto ha un limite di rilevazione del 12,5%, mentre l'HRMA è in grado di identificare fino al 3% di alleli mutati, la più bassa diluizione testata. Pertanto, è stato possibile riconoscere i quattro casi mutati grazie all'elevata sensibilità della HRMA. D'altronde, il sequenziamento diretto può diagnosticare falsi negativi quando la distribuzione delle cellule tumorali è eterogenea all'interno del campione. L'eterogeneità genetica tumorale è un evento piuttosto comune, che si verifica in almeno il 10% dei casi, anche in aree tissutali adiacenti. (46,47) E' da segnalare che la revisione microscopica delle sezioni all'ematossilina-eosina ha confermato in tutti i casi la presenza di un'adeguata quota di cellule neoplastiche (dati non mostrati). La correlazione tra l'eterogeneità dello stato mutazionale del gene KRAS e il beneficio clinico della terapia con cetuximab è stata ampiamente indagata (52) e attualmente sono presenti in letteratura solo studi retrospettivi. In uno studio recente di Bando et al. (49) 47 pazienti, risultati wild-type al sequenziamento diretto e trattati con cetuximab, sono stati analizzati nuovamente con la metodica dell'amplification refractory mutation system–Scorpion assay (ARMS/S); nove pazienti, che non avevano risposto al cetuximab, sono stati identificati come mutati all'ARMS/S. In uno studio analogo di Molinari et al. (48) 13 pazienti su 49 esaminati (27%), risultati WT al sequenziamento diretto, si sono dimostrati mutati con una metodica molto sensibile come la mutations enriched-PCR (ME-PCR). Nessuno di questi pazienti ha tratto giovamento dalla terapia con cetuximab. I risultati dello studio di Bando e Molinari, in merito a PFS e OS, sono sovrapponibili a quelli del nostro studio. Al contrario, Santini et al. (52) hanno identificato cloni mutati con il pirosequenziamento in 3 pazienti su 29, precedentemente identificati come WT alla real-time PCR; tuttavia, questi pazienti hanno ottenuto una buona risposta al cetuximab. Pertanto, i dati in letteratura sono discordanti tra loro e sono il frutto di studi retrospettivi; quindi, allo stato, sono necessari ulteriori studi per stabilire quale sia il

limite di sensibilità per garantire un'accurata selezione dei pazienti da trattare con cetuximab.

In questo lavoro l'HRMA si è dimostrata una metodica riproducibile, sensibile e rapida per l'analisi mutazionale del gene KRAS, rivelandosi uno strumento efficace per predire la resistenza al cetuximab. Tuttavia, l'HRMA rappresenta una metodica di screening, i cui risultati positivi necessitano di essere confermati (51). In molti studi i campioni biotipici risultati mutati all'HRMA sono stati validati con il sequenziamento diretto (52). Tuttavia, come evidenziano i nostri risultati, quest'ultimo perde di sensibilità in presenza di una bassa concentrazione di alleli mutati. Nei quattro campioni HRMA-MUT, i prodotti della PCR che mostravano un alterato profilo di melting sono stati processati e confermati clonandoli. Nella routine diagnostica, la validazione dei risultati positivi all'HRMA deve essere ottenuta utilizzando kits riconosciuti dalla Comunità Europea come l'ARMS/S TheraScreen K-RAS Mutation Kit (DxS-QIAGEN, Manchester, UK) e il PyroMark Q24 KRAS Kit (QIAGEN, Duesseldorf, Germany), che sono stati approvati come test diagnostici, ma che hanno costi molto elevati (54). Pertanto, l'algoritmo diagnostico, basato sullo screening dei campioni mediante HRMA e successiva conferma con test validati, deve essere poco costoso, rapido, affidabile, in grado di rilevare l'eterogeneità genetica all'interno del tumore, in modo da poter selezionare i pazienti da trattare con cetuximab.

In conclusione, l'HRMA è una metodica in grado di identificare, in maniera più accurata del sequenziamento diretto, i pazienti da non trattare con il cetuximab, poiché è in grado di riconoscere anche un esiguo numero di cloni mutati che mostrano resistenza all'anticorpo anti-EGFR. Tuttavia, sono necessari studi prospettici per poter stabilire con maggiore accuratezza la relazione tra l'eterogeneità genetica tumorale, le metodiche da utilizzare per l'analisi dello stato mutazionale ed il relativo beneficio clinico della terapia con cetuximab.

FIGURE

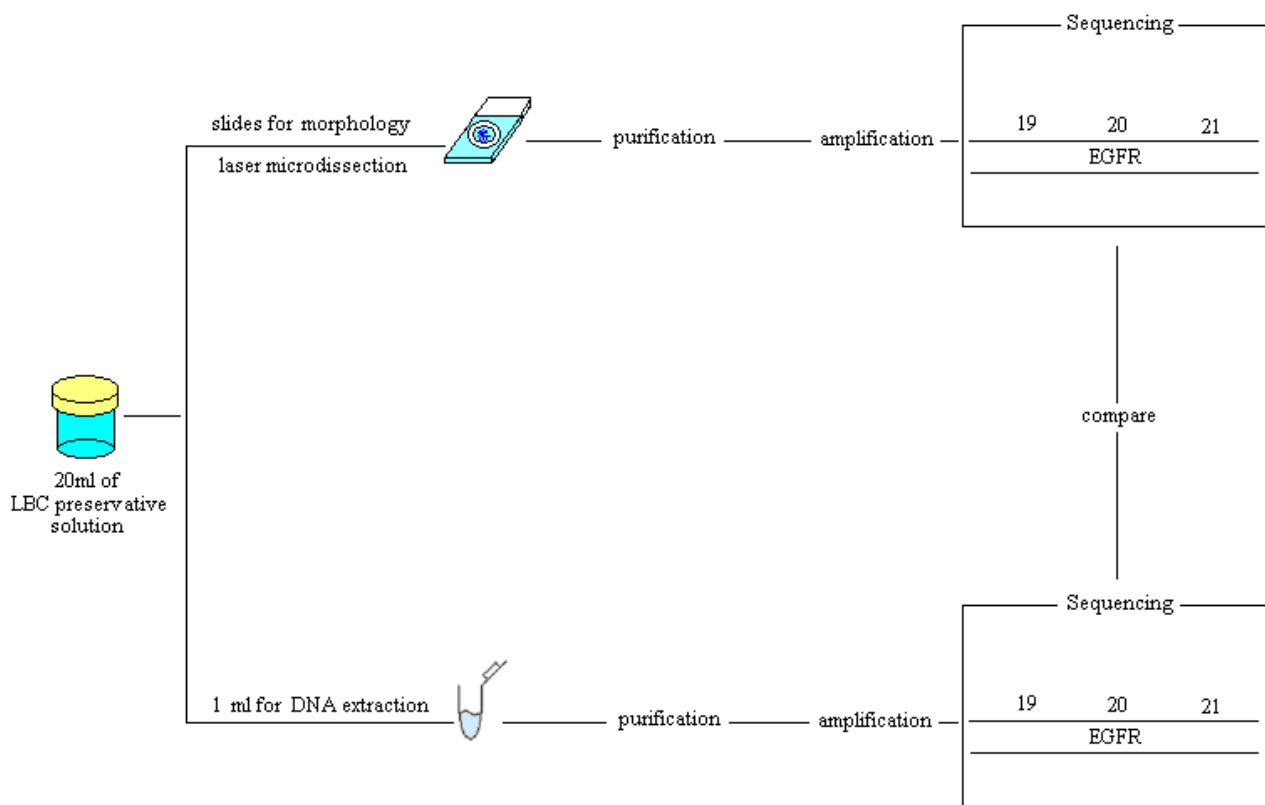


Figura 1. Disegno dello studio. Analisi delle alterazioni di EGFR sul DNA estratto direttamente dal *cell – pellet* e dal corrispondente DNA estratto dalle cellule prelevate dopo microdissezione laser di un vetrino LBC. LBC, liquid-based cytology.

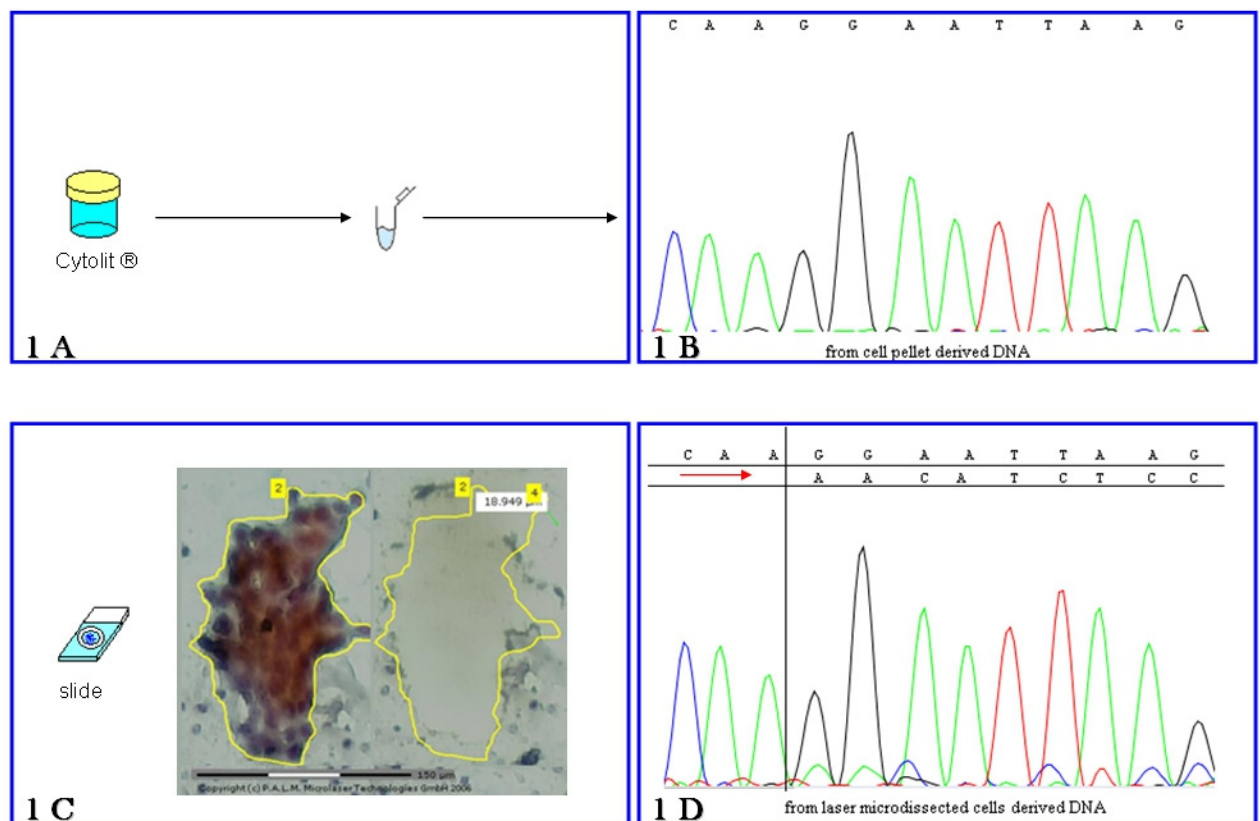


Figura 2. Elettroferogrammi che mostrano una sequenza wild-type (1B) e mutata (1D) dell'esone 19 di EGFR, ottenute rispettivamente dall'analisi del DNA estratto dal CytoLyt (1A) e dal DNA ottenuto dopo microdissezione laser (LCM) della componente neoplastica (1C). Nel pannello 1C è mostrato un ThinPrep colorato sec. Papanicolaou prima (I) e dopo (II) la LCM. La sequenza deleta è 2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC ed è mostrata dalla freccia rossa nel pannello 1D.

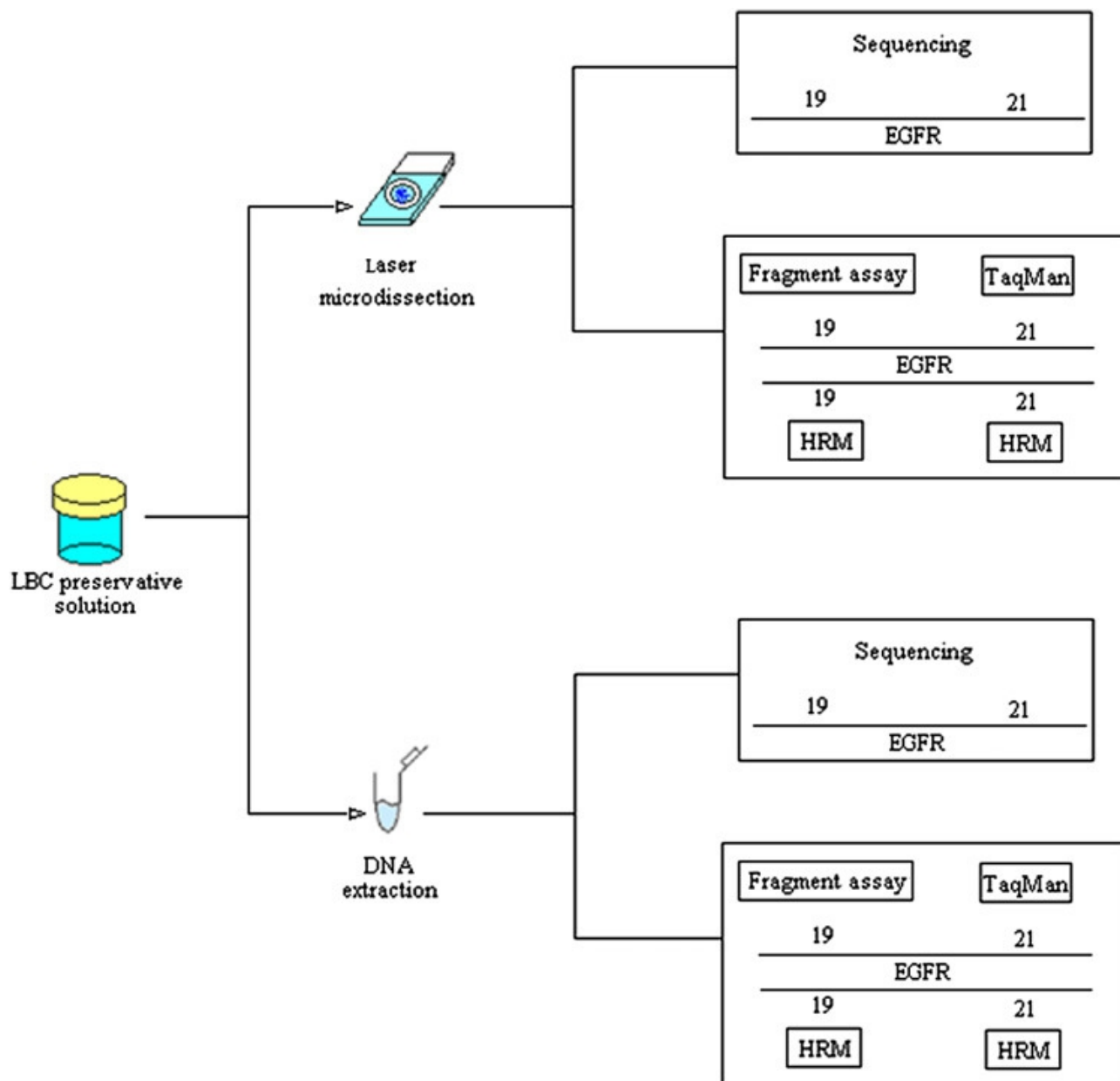


Figura 3. Disegno dello studio. Sul DNA estratto direttamente dal *cell – pellet* e su quello ottenuto dopo microdissezione laser della componente neoplastica, la valutazione dello stato mutazionale di EGFR è avvenuta, oltre che per sequenziamento genico diretto, anche mediante High Resolution Melting Analysis, saggio per l’analisi della lunghezza dei frammenti e saggio con sonde TaqMan. LBC, liquid-based cytology.

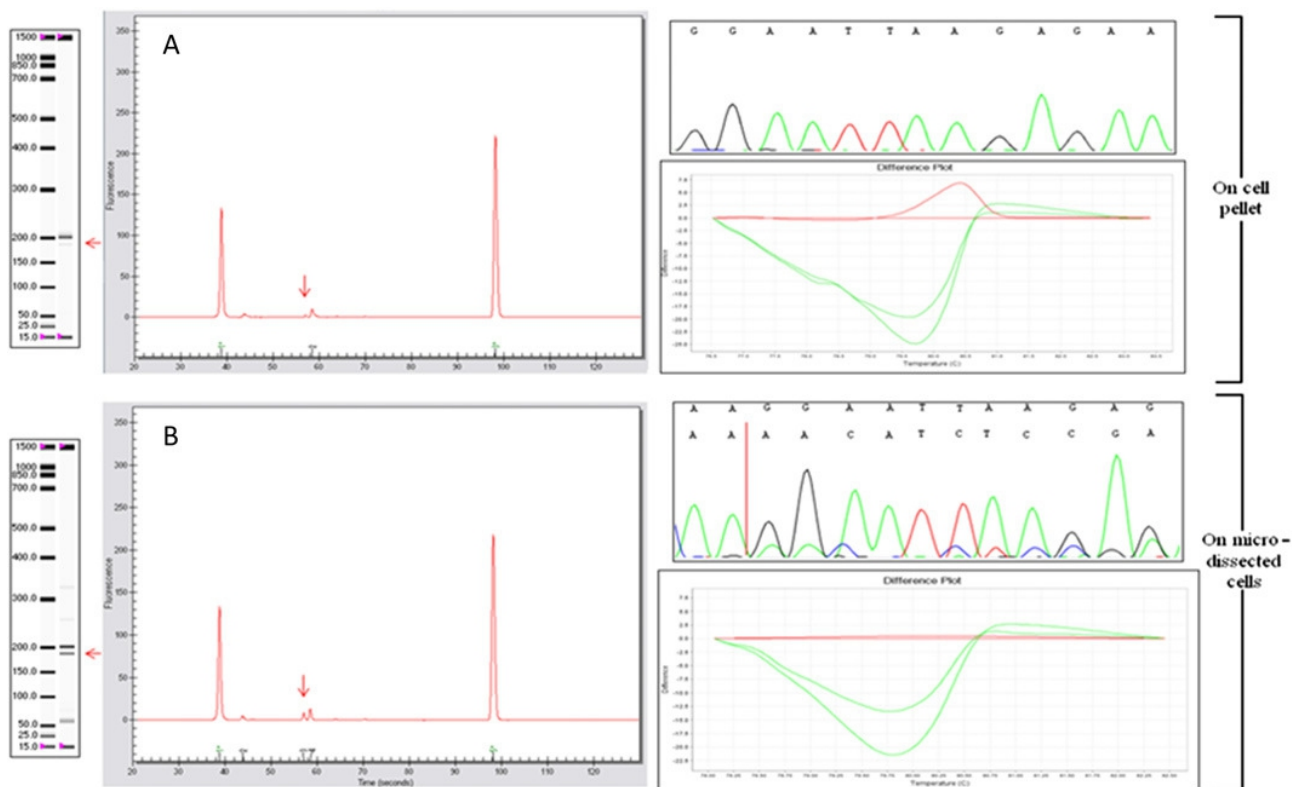


Figura 4. Caso 44. (A) Cell pellet; la delezione E746_A750 dell'esone 19 è stata rilevata dal saggio per l'analisi dei frammenti (freccia rossa), dall'HRMA (*difference plot*) ma non dal sequenziamento genico diretto. (B) Analisi condotta su DNA estratto da cellule microdissezionate al laser. In questo caso la delezione E746_A750 dell'esone 19 è stata rilevata da tutte le tecniche impiegate.

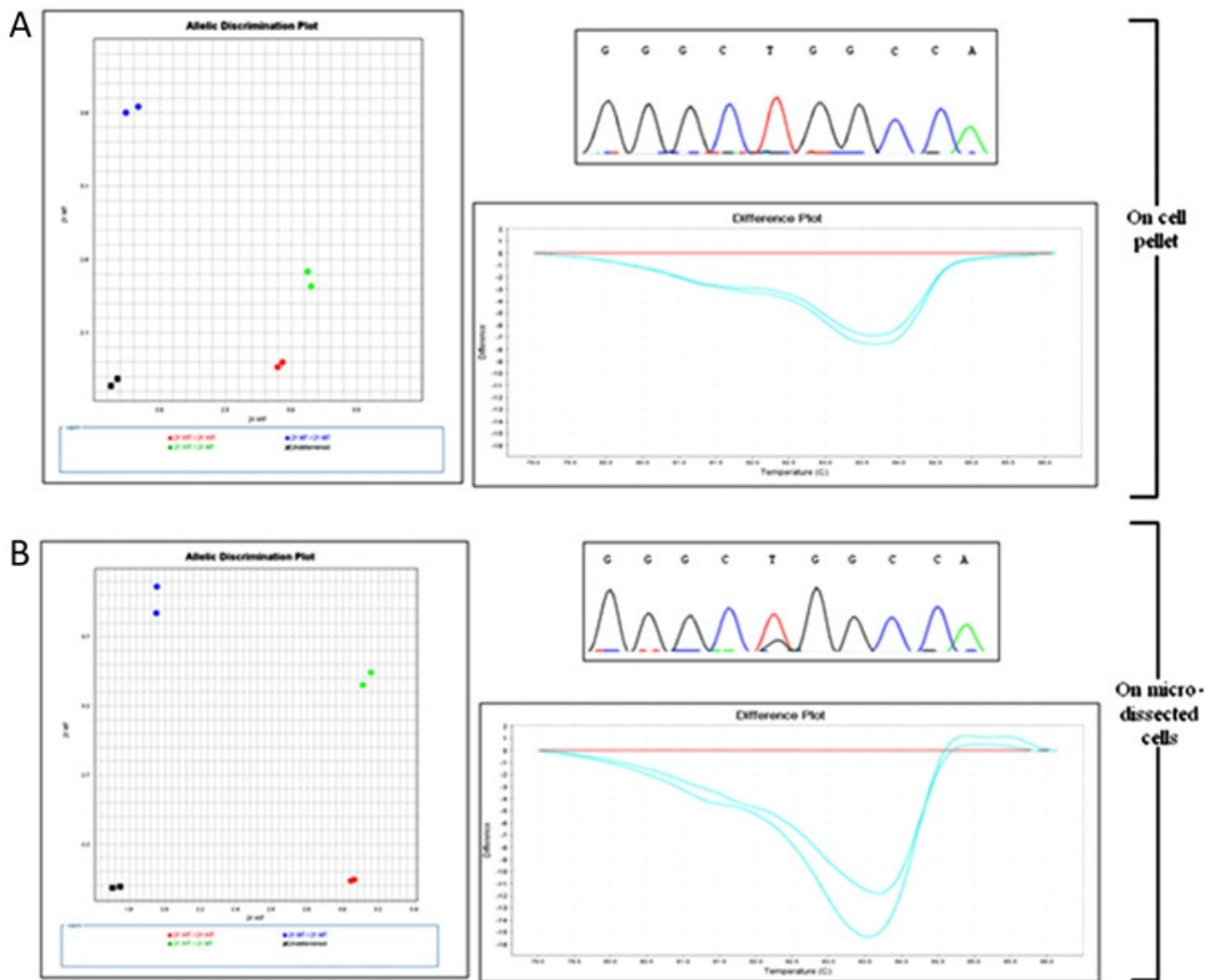


Figura 5. Caso 17. (A) *Cell pellet*. La mutazione L858R dell'esone 21 è stata rilevata dal saggio TaqMan (*allelic discrimination plot*) e dall'HRMA (*difference plot*) ma non dal sequenziamento genico diretto. (B) Analisi del DNA estratto dalle cellule neoplastiche microdissezionate al laser. in questo caso la mutazione L858R dell'esone 21 è stata rilevata da tutte le tecniche impiegate.

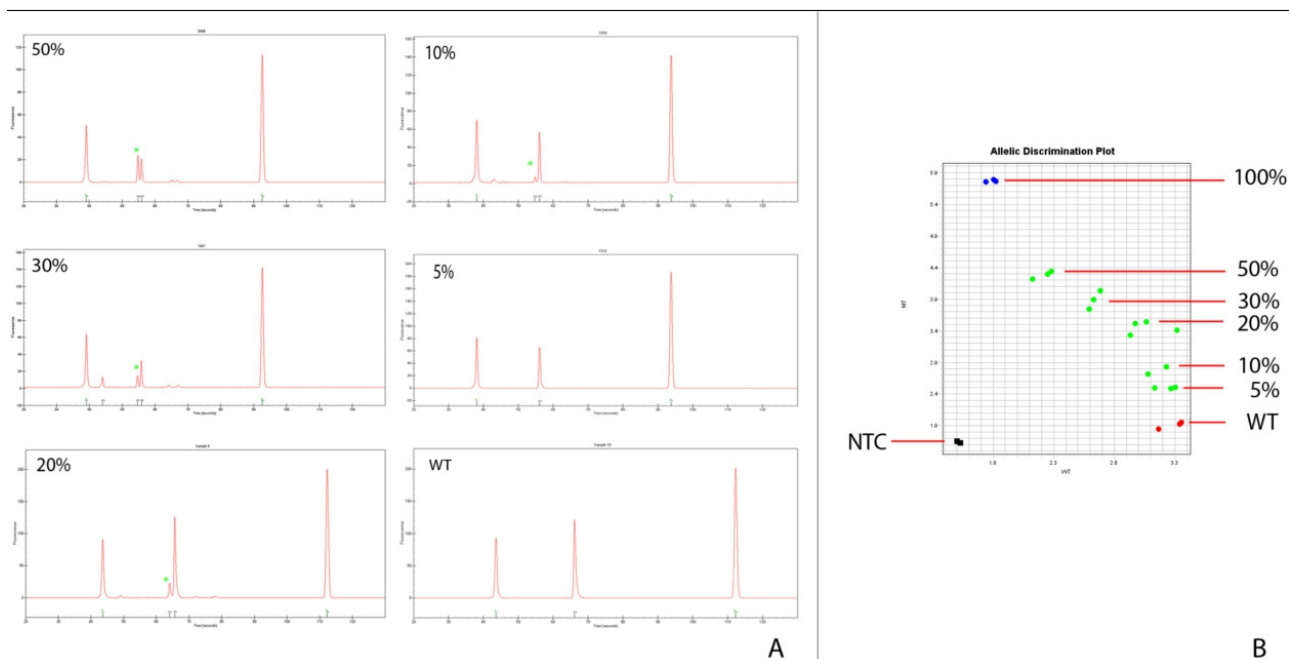


Figura 6. Validazione analitica del saggio: rilevazione della quantità minima di allele mutato (LOD). Diluizioni seriali di linee cellulari mutate (PC9 and H1975) e WT (A549 EGFR) al 50%, 30%, 20%, 10% e 5%. Come mostrato nel pannello A (indicato dai punti verdi) , il LOD per l'esone 19 è risultato del 10%, mentre, come mostrato nel pannello B, il LOD per la mutazione L858R dell'esone 21 è risultato essere del 5%. NTC: Non Template Control.

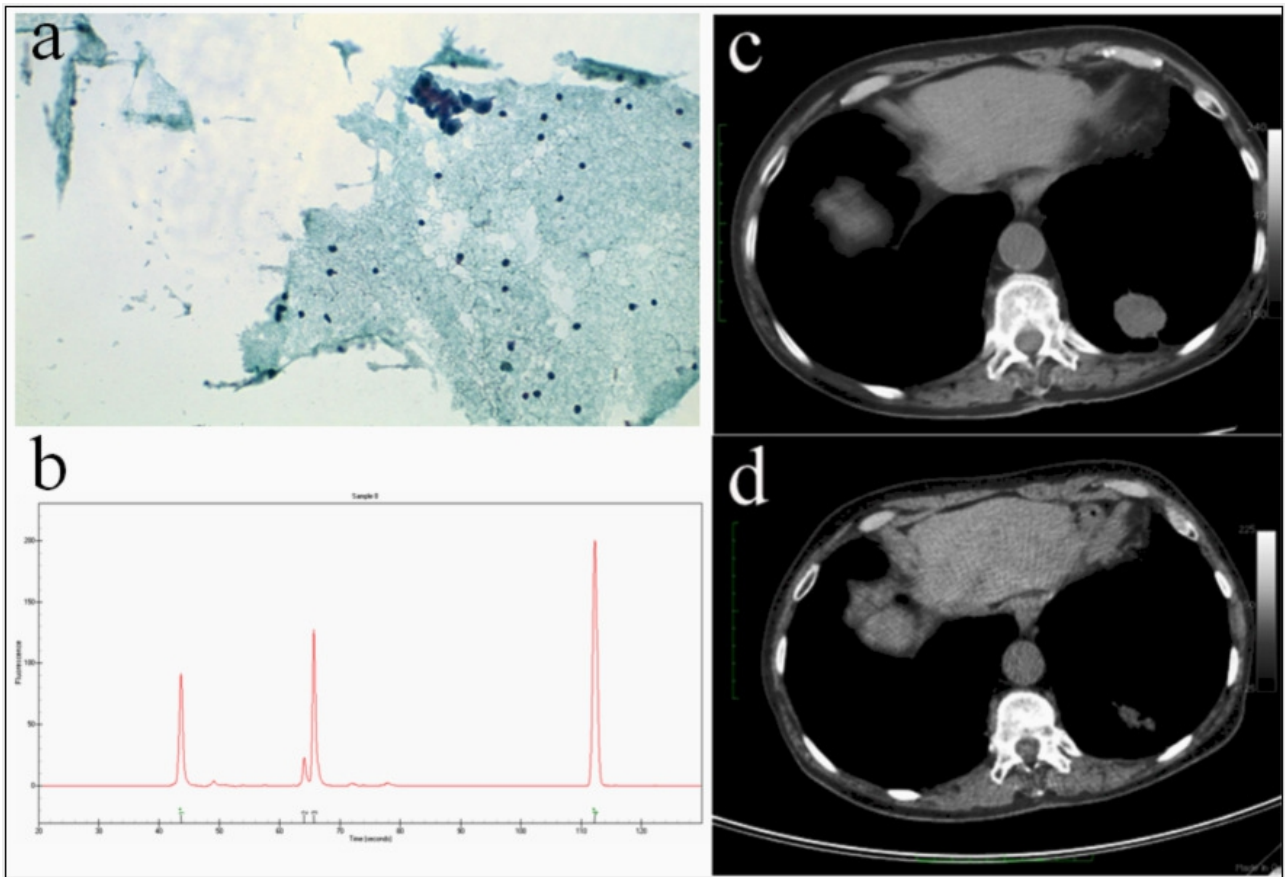


Figura 7. Una delezione dell'esone 19 di EGFR rilevata dal saggio per l'analisi della lunghezza dei frammenti (b) su DNA estratto da cellule di ADC (a) di un pazienti che ha mostrato una risposta parziale al trattamento con gefitinib, come mostrato dalla TC basale (c) e durante il corso del trattamento (d) CT. In questo specifico caso, il sequenziamento genico diretto non era stato in grado di rilevare l'alterazione.

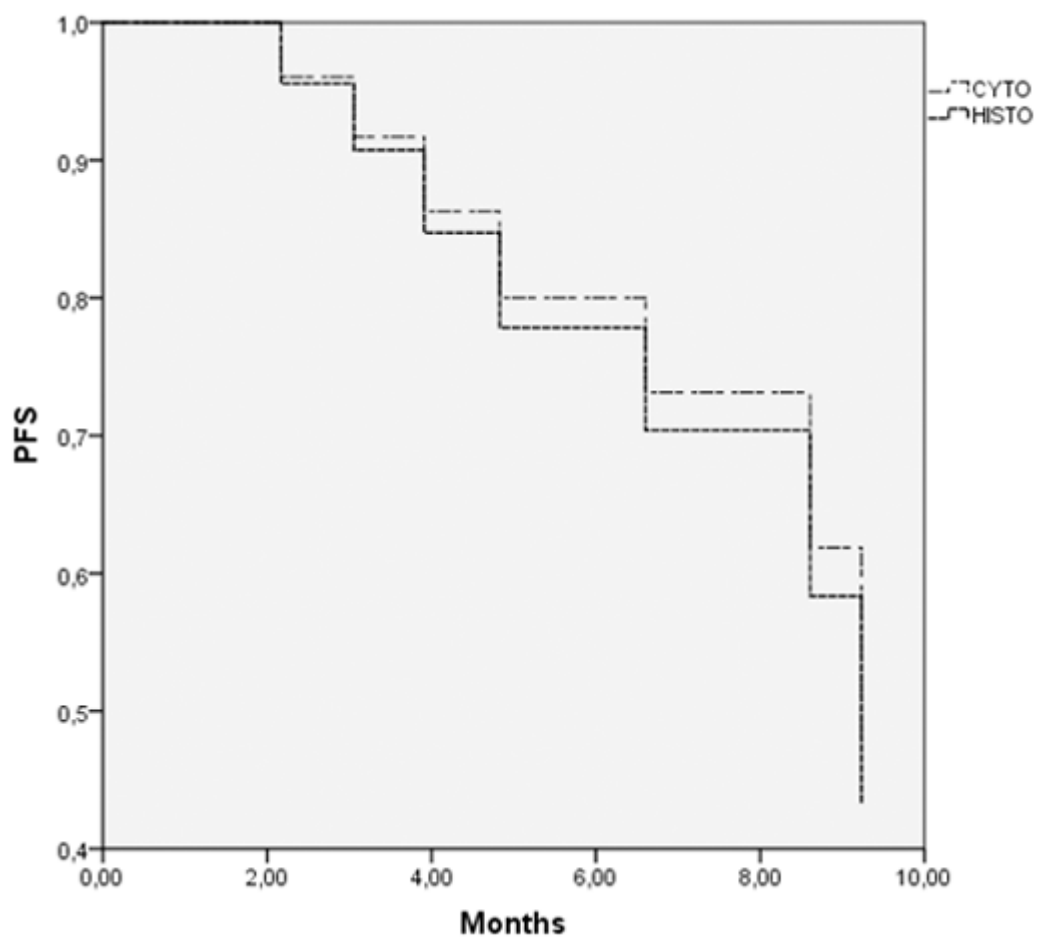


Figura 8. I dati relativi alla PFS dei pazienti trattati con gefitinib, le cui mutazioni di EGFR sono state identificate su campione citologico o su campione istologico, sono messi a confronto con curve di Kaplan – Mayer mostrando l’esistenza di una differenza non significativa ($p = 0.88$).

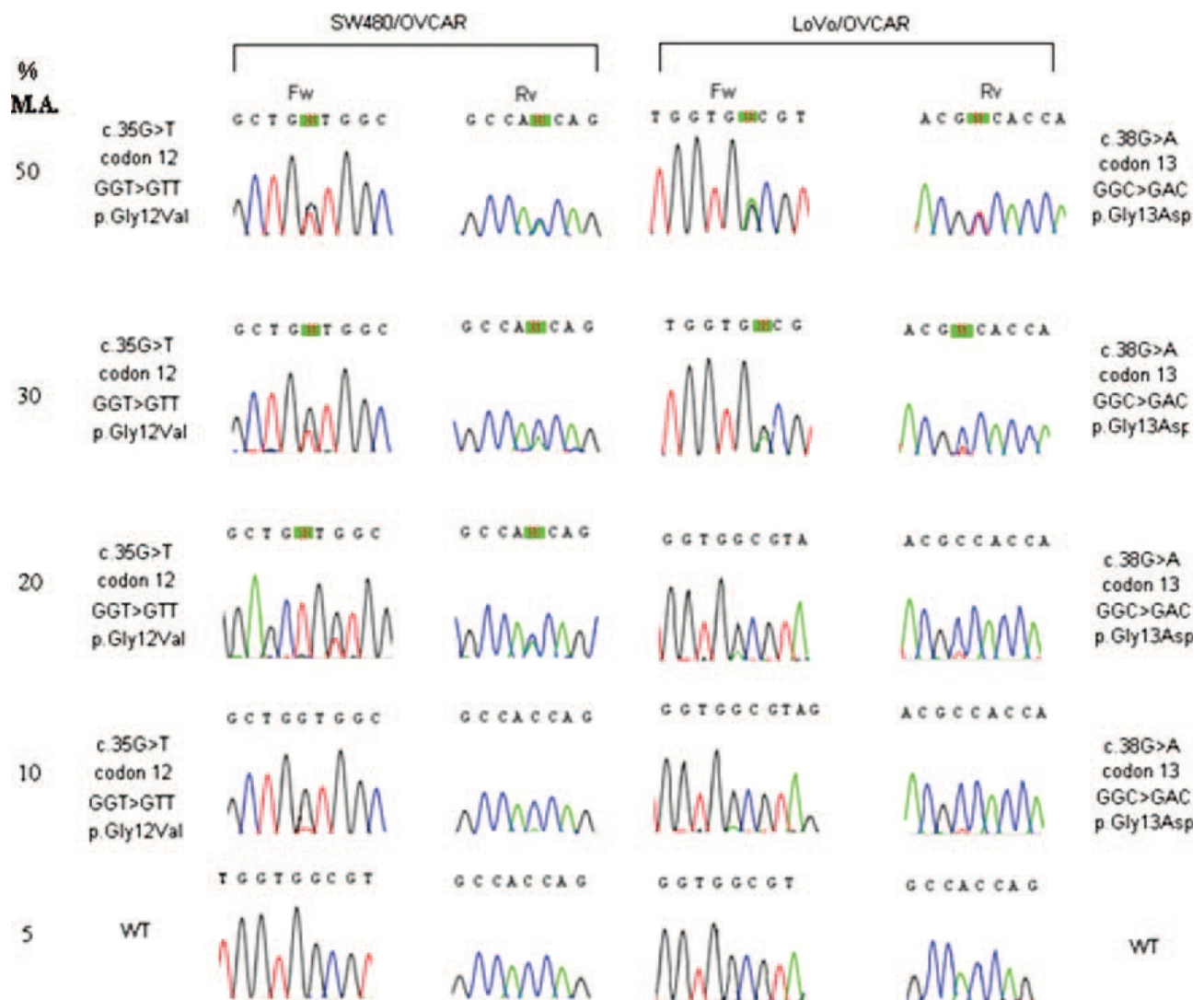


Figura 9. Diluizioni seriali (50%, 30%, 20%, 10% and 5%) di DNA ottenuto da linee cellulari mutate e wild – type per KRAS. Il limite di rilevazione dell’allele mutato di KRAS è risultato del 10%.

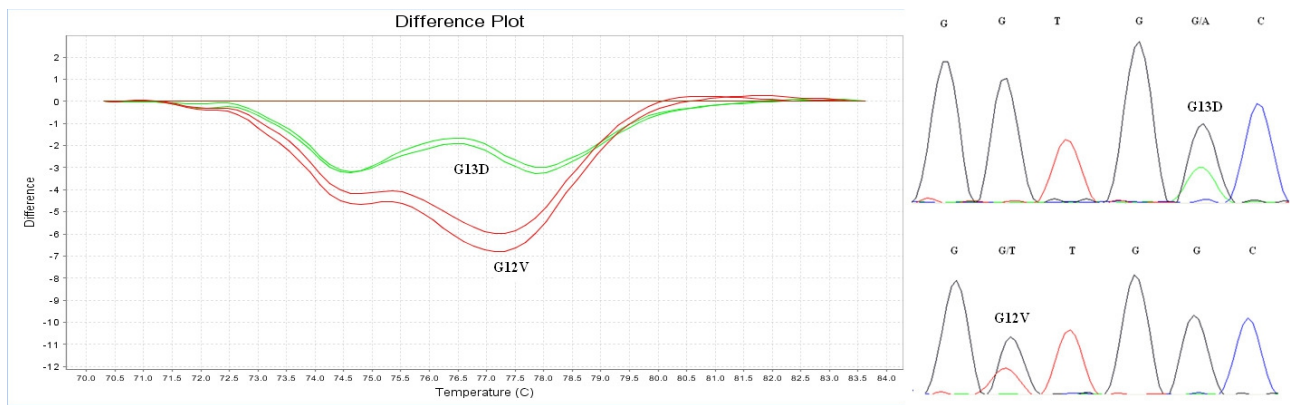


Figura 10. High-resolution melting analysis dei codoni 12 e 13 dell'esone 2 di KRAS. La linea marrone indica il controllo wild-type (wt), le due linee verdi e rosse rappresentano rispettivamente le mutazioni G13D e G12V. Sulla destra sono riportati i corrispondenti risultati al sequenziamento diretto.

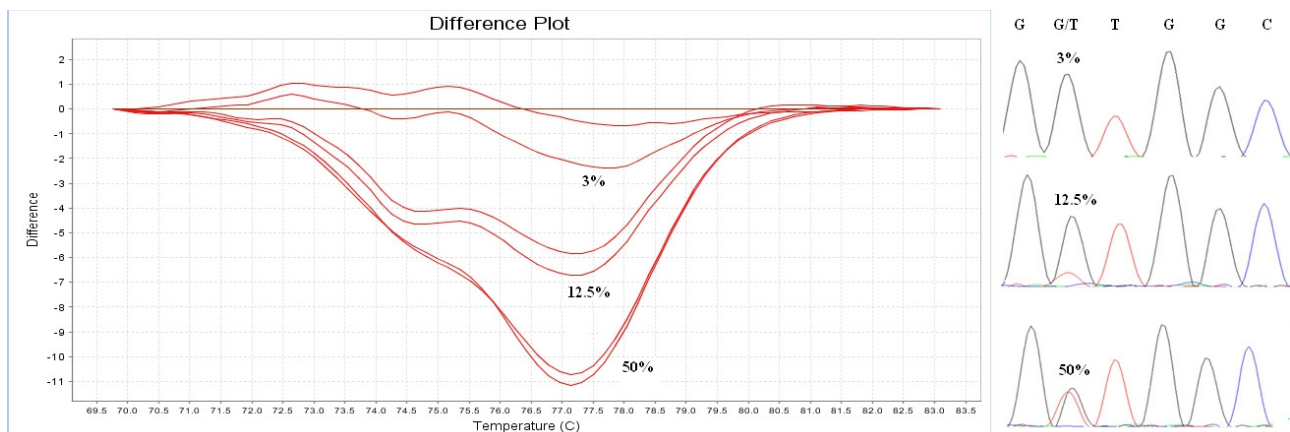


Figura 11. Difference plots originati dalle diluizioni seriate delle linee cellulari H441, portatrici della mutazione G12V, miscelate con il DNA KRAS wild type PC-9 al 50%, 12.5% e 3%. L'HRMA è stata in grado di rilevare il 3% di DNA mutato, che rappresenta la più bassa diluizione testata, mentre il limite inferiore del sequenziamento diretto è alla diluizione del 12,5%, come mostrato sulla destra dai corrispondenti risultati all'elettroforesi.

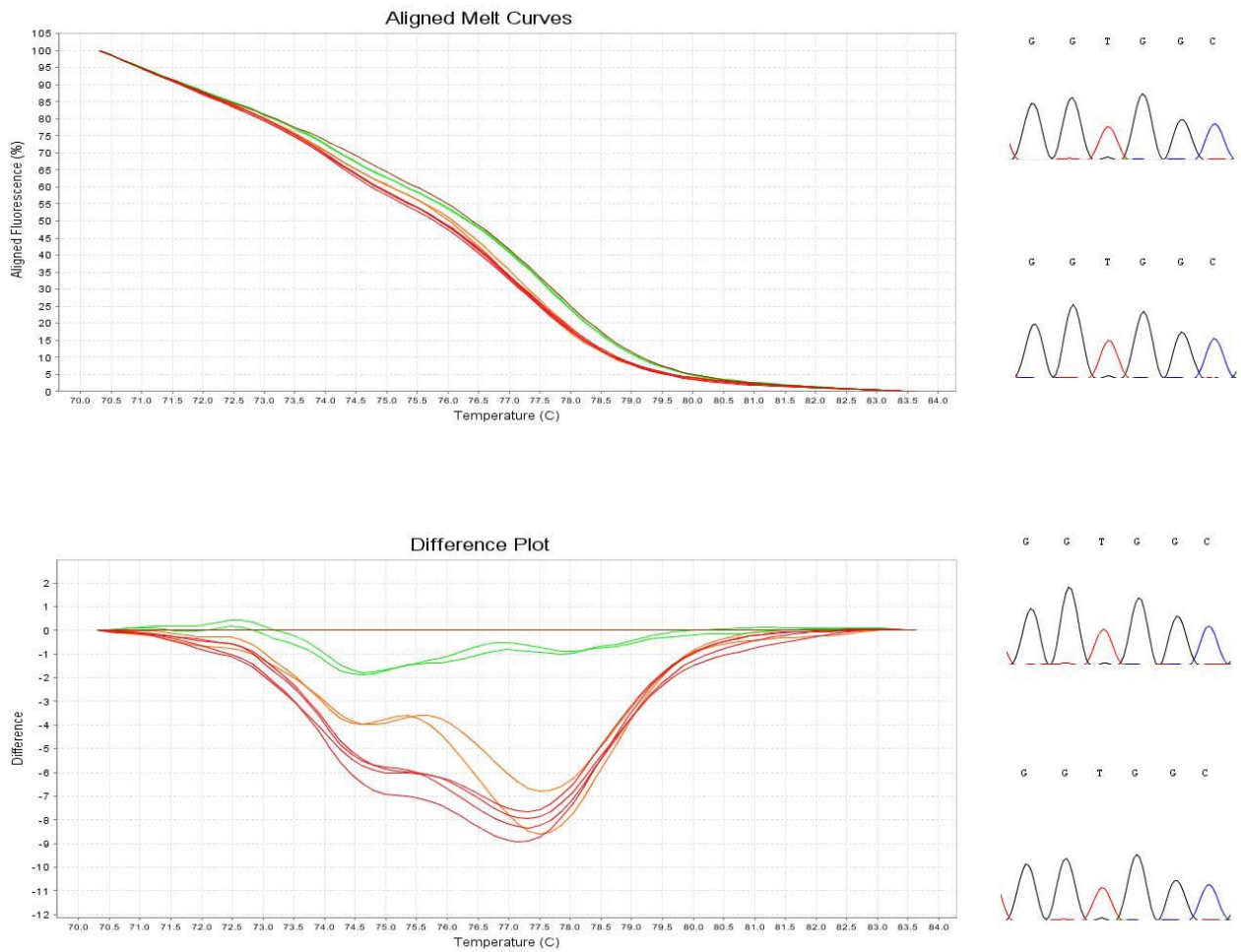


Figura 12. Normalized melting curve e difference plots dei quattro campioni mutati all'HRMA; ogni campione è rappresentato in duplicato. La linea marrone rappresenta il controllo wild-type (wt). A destra i grafici corrispondenti degli stessi campioni analizzati con il sequenziamento diretto.

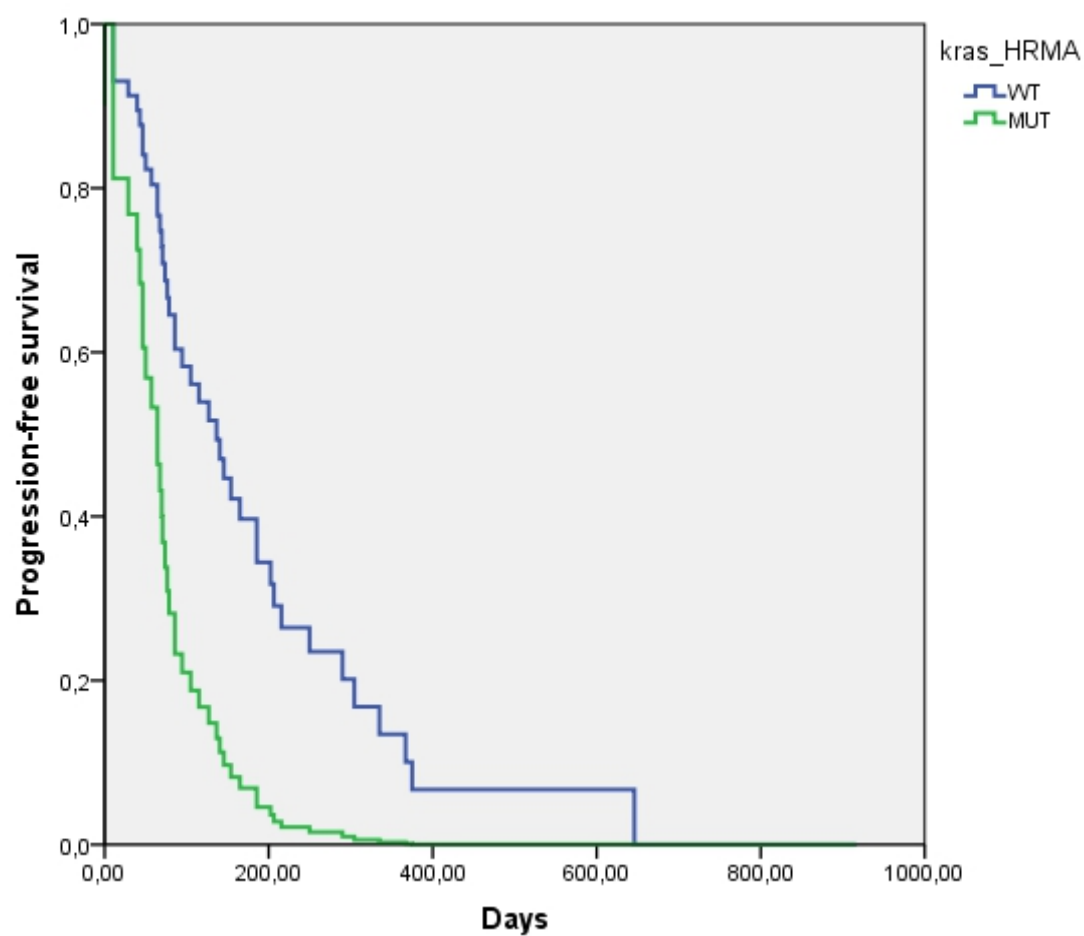


Figura 13. Kaplan–Meier plots della progression-free survival (PFS) sulla base dello stato di KRAS all’HRMA. Nei pazienti trattati con schemi contenenti cetuximab, la PFS media è stata di 5.1 mesi negli HRMA wild-type (linea blu) rispetto a 2.5 mesi negli HRMA mutati (linea verde). La differenza si è rivelata statisticamente significativa (HR=0.34, P=0.04).

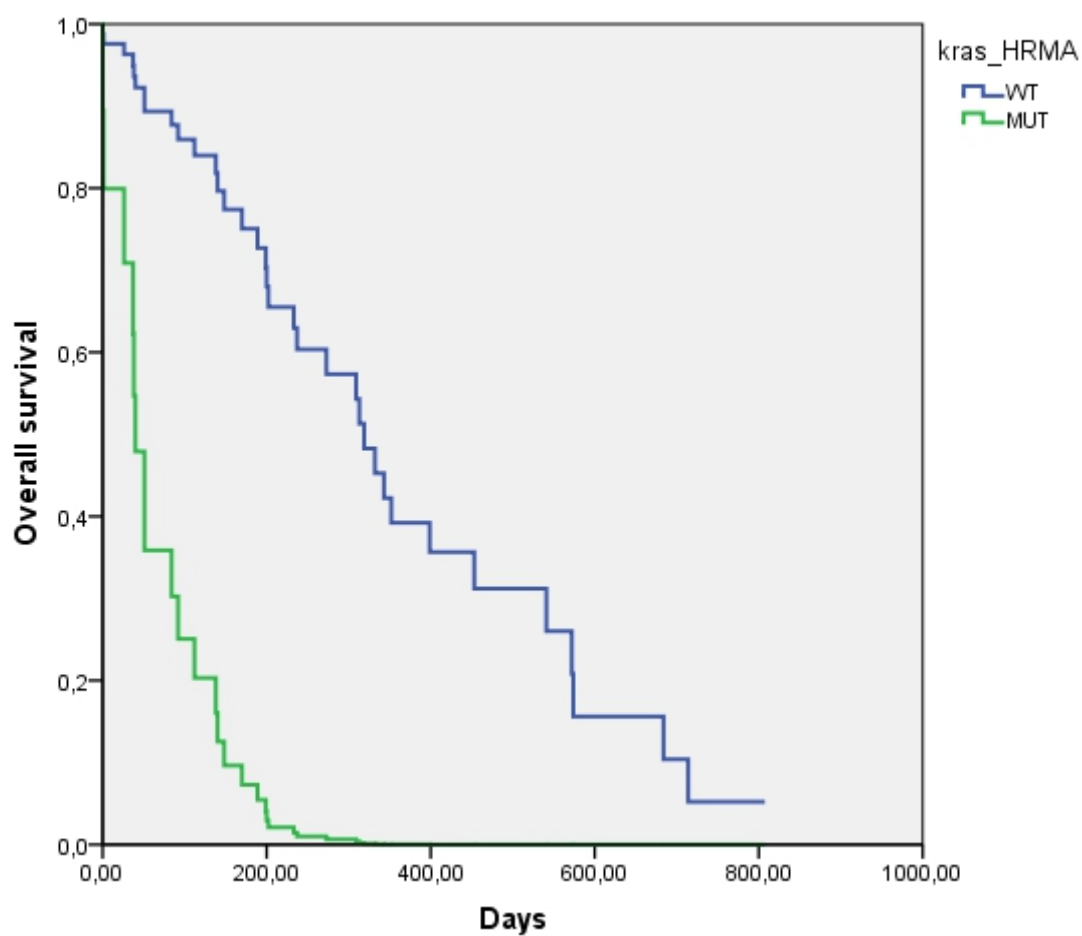


Figura 14. Kaplan–Meier plots dell’overall survival (OS) sulla base dello stato di KRAS determinato mediante HRMA. Nei pazienti trattati con schemi contenenti cetuximab, l’OS media è stata rispettivamente di 11,3 mesi per gli HRMA wild-type (linea blu) e di 3,2 mesi nei mutati (linea verde). La differenza è stata statisticamente significativa ($HR=0.11$, $P=0.001$).

TABELLE

Number	Sex	Age	SmokingHistory	Ethnicity	Site	Sample	Morphology	Cell-pellet		Laser Microdissected		Finally Interpretations	
								EGFR status	KRAS status	EGFR status	KRAS status	EGFR status	KRAS status
1	M	86	Smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	WT	G12F	WT	G12F	WT	G12F
2	M	86	Smoker	Caucasian	Lung	FNA	NSCLC NOS	WT	G12C	WT	G12C	WT	G12C
3	M	63	Smoker	Caucasian	Lung	FNA	NSCLC NOS	WT	WT	WT	WT	WT	WT
4	M	60	Smoker	Caucasian	Lung	FNA	SQCC	WT	WT	WT	WT	WT	WT
5	M	64	Former smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	WT	WT	WT	WT	WT	WT
6	F	54	Never smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	WT	WT	WT	WT	WT	WT
7	M	65	Former smoker	Caucasian	Liver	FNA	ADC	WT	WT	WT	WT	WT	WT
8	F	66	Smoker	Caucasian	Lung	FNA	SQCC	WT	WT	WT	WT	WT	WT
9	M	62	Former smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	WT	WT	WT	WT	WT	WT
10	M	69	Smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	WT	WT	WT	G12D	WT	G12D
11	F	64	Never smoker	Caucasian	Lymph node	FNA	ADC	WT	WT	WT	G12S	WT	G12S
12	F	52	Former smoker	Caucasian	Lung	TBNA	ADC	WT	WT	WT	WT	WT	WT
13	F	62	Never smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	WT	WT	WT	WT	WT	G12V
14	M	69	Former smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	WT	WT	WT	G12V	WT	WT
15	M	64	Former smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	WT	WT	WT	WT	WT	G12D
16	M	71	Former smoker	Caucasian	Lymph node	FNA	ADC	WT	WT	WT	WT	WT	WT
17	M	68	Former smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	WT	WT	WT	WT	WT	WT
18	M	75	Former smoker	Caucasian	Pleura	Pleural effusion	ADC	WT	WT	WT	WT	WT	WT
19	F	66	Smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	WT	G12S	WT	G12S	WT	G12S
20	M	63	Former smoker	Caucasian	Lymph node	FNA	NSCLC NOS	WT	WT	WT	WT	WT	WT
21	F	79	Never smoker	Caucasian	Pleura	Pleural effusion	NSCLC NOS	WT	G12S	WT	G12S	WT	G12S
22	M	62	Smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	WT	WT	WT	WT	WT	WT
23	M	79	Former smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	WT	G12V	WT	G12V	WT	G12V
24	F	65	Never smoker	Asian	Lung	FNA	ADC	WT	WT	WT	WT	WT	WT
25	M	56	Former smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	E746_A750del	WT	E746_A750del	WT	E746_A750del	WT
26	F	37	Former smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	WT	WT	WT	WT	WT	WT
27	M	70	Former smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	E746_A750del	WT	E746_A750del	WT	E746_A750del	WT
28	M	64	Smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	WT	WT	WT	WT	WT	WT
29	M	74	Former smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	WT	WT	WT	WT	WT	WT
30	M	78	Former smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	WT	WT	L747_A750del	WT	L747_A750del	WT
31	F	79	Former smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	L858R	WT	L858R	WT	L858R	WT
32	M	62	Former smoker	Caucasian	Lung	FNA	NSCLC NOS	WT	WT	WT	WT	WT	WT
33	M	77	Former smoker	Caucasian	Lung	FNA	NSCLC NOS	WT	WT	WT	WT	WT	WT
34	M	76	Former smoker	Caucasian	Lung	FNA	NSCLC NOS	WT	WT	WT	WT	WT	WT
35	F	76	Former smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	WT	WT	WT	WT	WT	WT
36	M	57	Smoker	Caucasian	Pleura	Pleural effusion	ADC	WT	WT	E746_A750del	WT	E746_A750del	WT
37	F	54	Smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	WT	WT	WT	WT	WT	WT
38	M	47	Smoker	Caucasian	Lymph node	TBNA	ADC	WT	WT	E746_A750del	WT	E746_A750del	WT
39	M	63	Former smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	WT	WT	E746_A750del	WT	E746_A750del	WT
40	M	62	Smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	WT	WT	WT	WT	WT	WT
41	M	61	Former smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	WT	WT	WT	WT	WT	WT
42	F	73	Former smoker	Caucasian	Lung	FNA	ADC	E746_A750del	WT	E746_A750del	WT	E746_A750del	WT

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti (sesso, età, abitudine al fumo, etnia) e dei campioni (sito, tipo e diagnosi citologica) correlate allo stato mutazionale di EGFR.

C.	Cell pellet						Microdissected cells					
	Sequencing		Fragment 19	HRMA 19	TaqMan 21	HRMA 21	Sequencing		Fragment 19	HRMA 19	TaqMan 21	HRMA 21
	19	21					19	21				
17	WT	WT	WT	WT	L858R	MT	WT	L858R	WT	L858R	MT	WT
38	WT	WT	WT	WT	L858R	MT	WT	L858R	WT	WT	L858R	MT
42	WT	WT	WT	WT	L858R	MT	WT	L858R	WT	WT	L858R	MT
44	WT	WT	MT	MT	WT	WT	ELREA	WT	MT	MT	WT	WT

Tabella 2. Descrizione dei quattro casi discordanti.

Characteristic	Cytology n.	Histology n.		<i>p</i>
	364	318	682	
Gender				
<i>Female</i>	92	94	186	0.12
<i>Male</i>	272	224	496	
Smoking				
<i>Yes</i>	116	102	218	0.5
<i>No</i>	248	216	464	
Tumor Type				
<i>ADC</i>	227	215	442	0.08
<i>SCC</i>	21	24	45	
<i>NSCLC favors ADC</i>	51	33	83	
<i>NSCLC favors SCC</i>	6	3	9	
<i>NOS</i>			74	
<i>Other</i>	59	43	29	

Tabella 3. Caratteristiche dei pazienti (sesso, abitudine al fumo) e dei campioni (sub tipizzazione morfologica).

Specimen	Number tested	Number rejected	Total number	Per cent rejections
FNAB	235	39	274	14.20%
TBNA	25	6	31	19.30%
Pleural effusion	24	6	30	20%
Bronchial washing/brushing	20	7	27	24.13%
Sputum	1	1	2	50%
Total	305	59	364	

Tabella 4. Tecniche di campionamento e rate di campioni citologici inadeguati.

Characteristic	Mutant rate
Cytology n = 294	27/52 (51.9%)
Histology n = 304	25/52 (48.1%)
Female	32/52 (61.5%)
Male	20/52 (38.4%)
Smoking	
Yes	10/52 (19.2%)
No	42/52 (80.7%)
Tumor Type	
ADC	42/52 (80.7%)
SCC	1/52 (1.9%)
NSCLC favors ADC	6/52 (11.5%)
NSCLC favors SCC	0/52 (0%)
NSCLC-NOS	3/52 (3.7%)
Other	0/52 (0%)

Tabella 5. Distribuzione delle mutazioni in relazione al sesso, all'abitudine al fumo e all'istotipo.

Patients	Clinical characteristics	Mutations											Mutations
		G12D	G12V	G12C	G12A	G12S	G12R	G12dup	G13D	G13C	G13V	G13A	
1691	Gender												
	Male	112	92	41	23	20	20	1	68	0	0	1	365
	Female	88	79	23	19	16	2	0	75	3	1	0	306
1691	Age (years)												
	<59	46	41	16	10	7	2	0	20	0	0	0	142
	≥60	154	130	48	32	29	7	1	123	3	1	1	529
1691	Site*												
	Primary	185	159	60	39	35	8	1	128	1	0	1	616
	Metastasis	15	14	4	3	0	1	0	15	2	1	0	55
543	Neoplastic cells percentage*												
	<30%	3	5	1	2	0	0	0	1	0	0	0	12
	≥30%	69	56	24	19	9	3	1	45	1	0	1	228
1406	Specimens												
	Resection	143	139	51	28	24	7	1	105	2	1	1	502
	Biopsy	19	13	5	6	3	1	0	17	1	0	0	65
1095	Fixation modalities (formalin)												
	Buffered	112	96	37	19	23	3	0	71	1	0	0	362
	Simple	25	12	5	3	2	1	0	17	1	0	0	66
1639	Stage*												
	I-III	97	85	28	14	18	3	1	61	0	0	0	307
	IV	103	171	67	42	36	9	1	143	0	1	1	364

Tabella 6. Distribuzione del tipo di mutazioni in relazione alle caratteristiche cliniche.

Cetuximab association	2nd line CT	3rd line CT
Irinotecan (25 patients)	3	22
FOLFIRI (22 patients)	22	—
FOLFOX (3 patients)	3	—
Total	28	22

Tabella 7. Regime di trattamento dei pazienti.

KRAS WT	N (%)
CR	1 (2)
PR	12 (24)
SD	15 (30)
PD	22 (44)
DCR	28 (56)
PFS (months)	4.4
OS (months)	10.4

CR, complete response; DCR, disease control rate; OS, overall survival; PD, progression disease; PFS, progression-free survival; PR, partial response; RR, response rate; SD, stable disease; WT, wild type.

Tabella 8. Rate di risposta dei pazienti trattati.

	HRMA WT	HRMA MUT	totale
Sesso (M/F)	31/15	4	50
Età	61	66	
Sito primitivo (Colon/Retto)	30/16	1/3	50
N. di linee di terapia			
1			
2	26	2	28
3	20	2	22
Siti di metastasi			
Fegato	18	2	20
Polmone	8	1	9
Multipli	20	1	21
Schedula di terapia			
Irinotecano	23	2	25
FOLFIRI	20	2	22
FOLFOX	3	-	3

Tabella 9. Caratteristiche dei pazienti.

BIBLIOGRAFIA

1. da Cunha Santos G, Saieg MA, Geddie W, Leighl N. EGFR gene status in cytological samples of nonsmall cell lung carcinoma: Controversies and opportunities. *Cancer Cytopathol* 2011;119:80-91.
2. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008;358:1160-74.
3. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:947-57.
4. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CQ, Kamel-Reid S, Squire J et al, Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med*. 2005;353:133-44
5. Horiike A, Kimura H, Nishio K, Ohyanagi F, Satoh Y, Okumura S, et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutation in transbronchial needle aspirates of non-small cell lung cancer. *Chest* 2007;131:1628-34.
6. Lim EH, Zhang SL, Yu K, Nga ME, Ahmed DA, Agasthian T, et al. An alternative approach to determining therapeutic choices in advanced non-small cell lung carcinoma (NSCLC): maximizing the diagnostic procedure and the use of low-volume lung biopsies. *J Thorac Oncol* 2007;2:387-96.
7. Asano H, Toyooka S, Tokumo M, Ichimura K, Aoe K, Ito S, et al. Detection of EGFR gene mutation in lung cancer by mutant-enriched polymerase chain reaction assay. *Clin Cancer Res* 2006;12:43-8.
8. Fassina A, Cappellesso R, Simonato F, Lanza C, Marzari A, Fassan M. Fine needle aspiration of non-small cell lung cancer: Current state and future perspective. *Cytopathology* 2012 ;23:213-19.
9. Molina-Vila MA, Bertran-Alamillo J, Reguart N, Taron M, Castella E, Llatjos M, et al. A sensitive method for detecting EGFR mutations in non-small cell lung cancer samples with few tumor cells. *J Thorac Oncol* 2008;3:1224-35.

10. Chowdhuri SR, Xi L, Pham TH, Hanson J, Rodriguez-Canales J, Berman A, et al. EGFR and KRAS mutation analysis in cytologic samples of lung adenocarcinoma enabled by laser capture microdissection. *Mod Pathol*.2012
11. Fukui T, Ohe Y, Tsuta K, Furuta K, Sakamoto H, Takano T, et al. Prospective study of the accuracy of EGFR mutational analysis by high-resolution melting analysis in small samples obtained from patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:4751-7.
12. Lozano MD, Zulueta JJ, Echeveste JI, Gurpide A, Seijo LM, Martin-Algarra S, et al. Assessment of epidermal growth factor receptor and K-ras mutation status in cytological stained smears of non-small cell lung cancer patients: correlation with clinical outcomes. *Oncologist* 2011;16:877-85.
13. Betz BL, Roh MH, Weigelin HC, Placido JB, Schmidt LA, Farmen S, et al. The application of molecular diagnostic studies interrogating EGFR and KRAS mutations to stained cytologic smears of lung carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2011 ;136:564-71.
14. Aisner DL, Deshpande C, Baloch Z, Watt CD, Litzky LA, Malhotra B, et al. Evaluation of EGFR mutation status in cytology specimens: An institutional experience. *Diagn Cytopathol*.2011
15. Billah S, Stewart J, Staerckel G, Chen S, Gong Y, Guo M. EGFR and KRAS mutations in lung carcinoma: molecular testing by using cytology specimens. *Cancer Cytopathol*;119:111-7.
16. Pang B, Matthias D, Ong CW, Dhewar AN, Gupta S, Lim GL, et al. The positive impact of cytological specimens for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer: a single South East Asian laboratory's analysis of 670 cases. *Cytopathology* 2012;23:229-36.
17. Allegrini S, Antona J, Mezzapelle R, Miglio U, Paganotti A, Veggiani C, et al. Epidermal growth factor receptor gene analysis with a highly sensitive molecular assay in routine cytologic specimens of lung adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol* 2012;138:377-81.

18. Malapelle U, Bellevicine C, Zeppa P, Palombini L, Troncone G. Cytology-based gene mutation tests to predict response to anti-epidermal growth factor receptor therapy: A review. *Diagn Cytopathol.* 2011
19. Malapelle U, de Rosa N, Rocco D, Bellevicine C, Crispino C, Illiano A, et al. EGFR and KRAS mutations detection on lung cancer liquid-based cytology: a pilot study. *J Clin Pathol.* 2012
20. Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Provencio M and others. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 2009;361:958.
21. Malapelle U, de Rosa N, Bellevicine C, Rocco D, Vitiello F, Piantedosi FV, et al. EGFR mutations detection on liquid-based cytology: is microscopy still necessary? *J Clin Pathol* 2012;65:561-4.
- 22 . Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2011;6:244-285.
23. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:205-216
24. Oshita F, Matsukuma S, Yoshihara M, et al. Novel heteroduplex method using small cytology specimens with a remarkably high success rate for analysing EGFR gene mutations with a significant correlation to gefitinib efficacy in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer.* 2006;95:1070-1075.
25. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol.* 2005;16:481-488.
26. Borner MM. Neoadjuvant chemotherapy for unresectable liver metastases of colorectal cancer- too good to be true? *Ann Oncol.* 1999;10:623-626.

27. Kemeny B. Management of liver metastases from colorectal cancer. *Oncology*. 2006;20:1161-1176.
28. Muratore A, Zorzi D, Bouzari H et al. Asymptomatic colorectal cancer with unresectable liver metastases: immediate colorectal resection or upfront systemic chemotherapy? *Ann Surg Oncol*. 2007;14:766-770.
29. Lenz H-J, Van Cutsem E, Khambata-Ford S et al. Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J Clin Oncol*. 2006;24:4914-1921.
30. Van Cutsem E, Peeters M, Siena S et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25:1658-1664.
31. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2007;357:2040-8.
32. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F et al. Epidermal growth factor related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1995;19:183-232.
33. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:505-516.
34. Hynes NH, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:341-354.
35. Normanno N, Bianco C, De Luca A et al. Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr Relat Cancer*. 2003;10:1-21.
36. Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD et al. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell*. 2005;7:301-311.
37. Hadari YR, Doody JF, Wang YF et al. The IgG1 monoclonal antibody cetuximab induces degradation of the epidermal growth factor receptor (abstract 234). Presented at the American

Society of Clinical Oncology Gastrointestinal Cancer Symposium; January 22-24, 2004; San Francisco, CA.

38. Prewett M, Rockwell P, Rockwell RF et al. The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.* 1996;19:419-427.

39. Naramura M, Gillies SD, Mendelsohn J et al. Therapeutic potential of chimeric and murine anti-(epidermal growth factor receptor) antibodies in a metastatic model for human melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 1993;37:343-349.

40. Zhang W, Gordon M, Schultheis AM et al FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *J Clin Oncol.* 2007;25:3712-3718.

41. Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy-focus on cetuximab. *Eur J Cancer.* 2001;37(suppl 4):S16-S22.

42. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, McAllister PK, Morton RF, Schilsky RL. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 2009;27:2091-6.

43. van Krieken JH, Jung A, Kirchner T, Carneiro F, Seruca R, Bosman FT, Quirke P, Flejou JF, Plato Hansen T, de Hertogh G and others. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch* 2008;453:417-31.

44. Bellon E, Ligtenberg MJ, Tejpar S, Cox K, de Hertogh G, de Stricker K, Edsjo A, Gorgoulis V, Hofler G, Jung A and others. External quality assessment for KRAS testing is needed: setup of a

european program and report of the first joined regional quality assessment rounds. *Oncologist*;16:467-78.

45. Tol J, Dijkstra JR, Vink-Borger ME, Nagtegaal ID, Punt CJ, van Krieken JH, Ligtenberg MJ. High sensitivity of both sequencing and real-time PCR analysis of KRAS mutations in colorectal cancer tissue. *J Cell Mol Med* 2009.

46. Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, Hartleb D, Stoecklein NH, Gabbert HE. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res*;16:790-9.

47. Richman SD, Chambers P, Seymour MT, Daly C, Grant S, Hemmings G, Quirke P. Intratumoral heterogeneity of KRAS and BRAF mutation status in patients with advanced colorectal cancer (aCRC) and cost-effectiveness of multiple sample testing. *Anal Cell Pathol (Amst)*;34:61-6.

48. Molinari F, Felicioni L, Buscarino M, De Dosso S, Buttitta F, Malatesta S, Movilia A, Luoni M, Boldorini R, Alabiso O and others. Increased detection sensitivity for KRAS mutations enhances the prediction of anti-EGFR monoclonal antibody resistance in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*;17:4901-14.

49. Bando H, Yoshino T, Tsuchihara K, Ogasawara N, Fuse N, Kojima T, Tahara M, Kojima M, Kaneko K, Doi T and others. KRAS mutations detected by the amplification refractory mutation system-Scorpion assays strongly correlate with therapeutic effect of cetuximab. *Br J Cancer*.

50. Malapelle U, Carlomagno C, Salatiello M, et al. KRAS mutation detection by high-resolution melting analysis significantly predicts clinical benefit of cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2012;107:626-631.

51. De Roock W, Jonker D, Di Nicolantonio F et al. association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA*. 2010;304:18212-18220.

52. Do H, Krypuy M, Mitchell PL, Fox SB, Dobrovic A. High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. *BMC Cancer* 2008;8:142.
53. Santini D, Galluzzo S, Gaeta L, Zoccoli A, Riva E, Ruzzo A, Vincenzi B, Graziano F, Loupakis F, Falcone A and others. Should Oncologists Be Aware in Their Clinical Practice of KRAS Molecular Analysis? *J Clin Oncol*;29:e206-7.
54. Kotoula V, Charalambous E, Biesmans B, Malousi A, Vrettou E, Fountzilas G, Karkavelas G. Targeted KRAS mutation assessment on patient tumor histologic material in real time diagnostics. *PLoS One* 2009;4:e7746.